Ruhr-Universität Bochum
Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
Institut für Physiologische Chemie

# Bildung extrazellulärer 3'-Ribonucleosidmonophosphate beim Basidiomyceten QM 806

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Ingrid Stumm
aus Duisburg

1981

Ruhr-Universität Bochum
Abteilung für Naturwissenschaftliche Medizin
Institut für Physiologische Chemie

# Bildung extrazellulärer 3'-Ribonucleosidmonophosphate beim Basidiomyceten QM 806

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Ingrid Stumm
aus Duisburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| | Abkürzungsverzeichnis | |
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | MATERIAL | 5 |
| 1. | Chemikalien | 5 |
| 2. | Pilz- und Bakterienstämme | 6 |
| 3. | Nährmedien | 6 |
| 3.1. | Flüssigmedium nach Reese und Mandels | 6 |
| 3.2. | NB-Medium | 7 |
| 3.3. | Glycerin-Minimalmedium (M9-Gly) | 7 |
| III. | METHODEN | 8 |
| 1. | Kultur der Organismen | 8 |
| 1.1. | Kultur des Basidiomyceten QM 806 | 8 |
| 1.2. | Kultur der Bakterien | 8 |
| 2. | Gewinnung des Untersuchungsmaterials vom Basidiomyceten QM 806 | 8 |
| 3. | Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung der UV-absorbierenden Substanzen | 9 |
| 3.1. | Chromatographische Methoden | 9 |
| 3.1.1. | Gelchromatographie an Sephadex G-10 | 9 |
| 3.1.2. | Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose | 10 |
| 3.1.3. | Dünnschicht- und Papierchromatographie | 11 |

3.2. Analytisch-chemische Methoden 12
3.2.1. Sprühreagenz zum Nachweis von Zuckerphosphaten 12
3.2.2. Phosphatbestimmung 12
3.2.3. Desoxyribosebestimmung 12
3.2.4. Pentosebestimmung 12
3.2.5. Glucosebestimmung 13
3.2.6. Proteinbestimmung 13
3.2.7. Isolierung des Zuckers und der Base aus Nucleosiden nach saurer Hydrolyse 13

3.3. Spektroskopische Methoden 13
3.3.1. UV-Spektren 13
3.3.2. Massenspektren 14
3.4. Isotachophorese 14

3.5. Enzymatische Methoden 14
3.5.1. Phosphatasen und Nucleotidasen 14
3.5.2. Purin- und Pyrimidinnucleosidphosphorylasen 15
3.5.3. Nachweis von Adenin mit der Xanthin-Oxidase 15
3.5.4. Nachweis von Guanin mit der Guanase 16
3.5.5. Nachweis von Cytidin mit der Cytidindesaminase 16

4. Gewinnung des Rohsaftes aus E. coli-Zellen mit Pyrimidinnucleosidphosphorylase- und Cytidindesaminaseaktivität 16

5. Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806 17

IV. ERGEBNISSE 19

1. Wachstumsverhalten des Basidiomyceten QM 806 19

2. UV-Spektren des Kulturfiltrats zu verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 19

3. Zusammensetzung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite in den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 22

4. Isolierung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite aus dem Kulturfiltrat des Basidiomyceten QM 806 24

4.1. Gelchromatographie an Sephadex G-10 24

4.2. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose 27

5. Charakterisierung der UV-absorbierenden Metabolite 27

5.1. Nachweis von Phosphat 28

5.1.1. Nachweis von Zuckerphosphaten auf Dünnschichtplatten 28

5.1.2. Phosphatbestimmung nach Fiske-SubbaRow 28

5.1.3. Enzymatische Bestimmung der Position der Phosphatgruppe 29

5.2. Charakterisierung der Zuckerkomponente 31

5.2.1. Analytisch-chemische Bestimmung der Zuckerkomponente 31

5.2.2. Dünnschicht- und papierchromatographische Bestimmung der Zuckerkomponente nach saurer und enzymatischer Hydrolyse 32

5.3. Charakterisierung der Basenkomponente 34
5.3.1. Dünnschichtchromatographie der Nucleotide, Nucleoside und Basen 35
5.3.2. UV-Spektren der Nucleoside und Basen 35
5.3.3. Massenspektren der Basen nach enzymatischer Hydrolyse 37
5.3.4. Enzymatische Charakterisierung der UV-absorbierenden Metabolite 41
5.3.5. Isotachophorese der UV-absorbierenden Metabolite 43
5.4. Mikrobiologische Untersuchung der UV-absorbierenden Metabolite 44
5.4.1. Untersuchung der UV-absorbierenden Metabolite auf Wuchsstoffcharakter mit purin- und pyrimidinauxotrophen Mutanten 44
5.4.2. Untersuchung der UV-absorbierenden Metabolite auf ihre antibiotische Wirksamkeit 47
6. Untersuchungen zur Herkunft der vom Basidiomyceten QM 806 ausgeschiedenen 3'-Ribonucleosidmonophosphate 47
6.1. Relation von Trockengewicht, extrazellulärem Protein und den extrazellulären 3'-Ribonucleosidmonophosphaten 47
6.2. Vergleich der extrazellulären Nucleotidkonzentration mit dem intrazellulären Gehalt an säurelöslichen Nucleotiden und an Nucleinsäuren 49
6.3. Markierungsversuche mit radioaktiven Purin- und Pyrimidinbasen 51
6.3.1. Aufnahme und Ausscheidung von radioaktiven Purinen und Pyrimidinen durch den Basidiomyceten QM 806 51

6.2. Vergleich der extrazellulären Nucleotidkonzentration mit dem intrazellulären Gehalt an säurelöslichen Nucleotiden und an Nucleinsäuren 49
6.3. Markierungsversuche mit radioaktiven Purin- und Pyrimidinbasen 51
6.3.1. Aufnahme und Ausscheidung von radioaktiven Purinen und Pyrimidinen durch den Basidiomyceten QM 806 51
6.3.2. Bestimmung der prozentualen Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 57
6.4. Ausscheidung der UV-absorbierenden Metabolite in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration 59
6.5. Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide in Abhängigkeit vom pH-Wert 59

V. DISKUSSION 62

VI. ZUSAMMENFASSUNG 72

VII. LITERATURVERZEICHNIS 73

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| atü | Atmosphäre(n) Überdruck |
| CMP | Cytidinmonophosphat |
| cpm | Zählimpulse pro Minute |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| g | Erdbeschleunigungskonstante ($9{,}81\ m\ sec^{-1}$) |
| GMP | Guanosinmonophosphat |
| h | Stunden |
| min | Minuten |
| M9-Gly | Glycerin-Minimalmedium |
| NB | Nutrient broth (Nährbouillon) |
| O.D. | Optische Dichte |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| TCA | Trichloressigsäure |
| Tris | Tris-hydroxymethyl-aminomethan |
| ÜK | Übernachtkultur |
| UMP | Uridinmonophosphat |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |

# I. EINLEITUNG

Der Basidiomycet QM 806 ist ein Pilz mit der Fähigkeit zur Synthese sehr hoher Mengen von Exoenzymen. Bei Mangel an exogenen Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen vermag er bis zu 30 % des Trockengewichtes in extrazelluläre Enzyme umzuwandeln (Friebe, 1973). Dabei werden insbesondere Glucosidasen und Proteasen sezerniert. Die Synthese und Sekretion dieser Enzyme unterliegt verschiedenen Steuerungsmechanismen (Friebe und Holldorf, 1975; Reese und Mandels, 1959).

Als Mikroorganismus zählt der Basidiomycet QM 806 zu den Fungi imperfecti. Er ist nicht zur Fruchtkörperbildung und zur geschlechtlichen Fortpflanzung befähigt, zeigt jedoch beim Wachstum des Mycels eine typische Schnallenbildung. Seinem biologischen Verhalten und nach dem Ort der ersten Isolierung (Neu Guinea) ist er zu den tropischen Holzzerstörern zu rechnen (Reese, persönliche Mitteilung).

Bei Untersuchungen über das Wachstum und über die Sekretion von Exoenzymen durch den Pilz werden regelmäßig auffällige Veränderungen im Kulturmedium beobachtet. Hierzu zählen insbesondere der Abfall des pH-Wertes in extrem saure Bereiche (pH 2,3) und die Ausscheidung von verschiedenen Metaboliten. Letztere fallen zunächst durch ihre sehr hohe UV-Absorption auf. Die UV-Spektren dieser Metabolite weisen zahlreiche Charakteristika von Purin- und Pyrimidinderivaten auf.

Purin- und Pyrimidinderivate als extrazelluläre Metabolite lassen sich in drei Gruppen einteilen. Es sind dies

(1) Zwischenprodukte des Auf- und Abbaues der normalen Nucleinsäurebausteine, die auch als Coenzyme für die Zelle von vitaler Bedeutung sind.

(2) substituierte Formen der normalen Nucleinsäurebausteine, die vor allem beim Abbau der tRNA, der mRNA und in geringerem Umfang auch der DNA entstehen. Diese

Substanzen werden wegen ihres Vorkommens in geringen Konzentrationen häufig als "seltene Basen" ("minor bases") bzw. deren Nucleosid- oder Nucleotidderivate bezeichnet (Lüpke und Seela, 1978). Bei diesen Nucleinsäurebausteinen ist zu beachten, daß durch Substitution nur die Purin- bzw. Pyrimidinbasen verändert werden. Die Verknüpfung der Basen mit den Zuckern erfolgt (mit Ausnahme des Ψ-Uridins) stets durch N-glykosidische Bindungen. Die Zucker sind stets Ribose oder 2-Desoxyribose.

(3) Verbindungen, die als Produkte des Sekundärstoffwechsels anzusehen sind. Hier sind bei Pilzen vor allem die zahlreichen Nucleosidantibiotika zu nennen, von denen heute über 50 verschiedene bekannt sind (Suhadolnik, 1970). Diese weichen in zahlreichen Strukturmerkmalen von den Nucleinsäurebausteinen ab, wobei sowohl die Basen als auch die Zucker stark verändert sein können. Auch findet sich hier neben der N-glycosidischen Bindung zwischen Base und Zucker häufiger eine C-glykosidische Bindung. Bei der Mehrzahl der Nucleosidantibiotika handelt es sich um hochtoxische Substanzen, die in der Therapie nicht anwendbar sind.

Biosynthese und Abbau der normalen Purin- und Pyrimidinnucleotide unterliegen in allen Zellen einer recht genauen Kontrolle (O'Donovan und Neuhard, 1970). Zur Ausscheidung von Zwischenprodukten der Nucleotidbiosynthese kommt es nur bei genetisch bedingten Defekten. Bei diesen kann es sich entweder um den Ausfall der katalytischen Wirkung eines Enzyms oder um die Veränderung von regulatorischen Eigenschaften von Enzymen handeln. Ein Beispiel für die Ausscheidung von Pyrimidinen aufgrund eines genetischen Defektes (Ausfall der OMP-Pyrophosphorylase) ist die Akkumulation von Orotsäure im Medium bei Neurospora crassa (Mitchell et al., 1948) oder bei E. coli (Yates und Pardee, 1956). Bei anderen Mutanten von E. coli oder S. typhimurium werden Orotsäure und Uracil als Produkte einer überhöhten Biosynthese bei

raschem Wachstum ausgeschieden. Hier hat sich ein Defekt in der Regulation der Pyrimidinbiosynthese nachweisen lassen (Womack und O'Donovan, 1978). Abbauprodukte der Nucleinsäuren werden in unterschiedlicher Weise ausgeschieden. Während die Pyrimidinderivate in den meisten Zellen vollständig zu $CO_2$ und $NH_3$ abgebaut werden, werden die Purine bei Eukaryonten häufig nur bis zum Hypoxanthin, Xanthin, zur Harnsäure oder bis zum Allantoin abgebaut. Hier bleibt also das Puringerüst in den meisten Fällen intakt. Die Kapazitäten der katabolischen Enzyme sind dabei in der Regel so hoch, daß auch bei hohem Umsatz von Nucleinsäuren die anfallenden Nucleotide abgebaut werden können.
Zur Ausscheidung von Nucleotiden, Nucleosiden oder Basen, die dem Abbau der Nucleinsäuren entstammen, kann es vor allem unter zwei Bedingungen kommen:
(1) Beim Ausfall von katabolischen Enzymen durch genetische Defekte und
(2) bei einem so hohen Abbau von Nucleinsäuren, daß die Kapazität der Nucleotid- bzw. Nucleosid-katabolisierenden Enzyme überschritten wird.
Durch den Ausfall von einzelnen Enzymen des Purinnucleotidabbaues kommt es bei Mutanten von Bacillus subtilis zur Ausscheidung hoher Mengen von Adenosin, Inosin und Xanthosin ( Haneda et al., 1971) oder zur Ausscheidung von Nucleosid-5'-monophosphaten. Die Nucleotide können dabei entweder durch extrazelluläre Hydrolyse von ausgeschiedenen Ribonucleinsäuren ( Demain et al., 1964) oder intrazellulär durch sekundäre Resynthese aus Inosin bzw. Xanthosin über Reaktionen des Salvage Pathways entstehen ( Akiya et al., 1972).Eine Überschreitung der Kapazität der Nucleotidabbauenden Enzyme kann bei Mikroorganismen vor allem bei Hungerzuständen eintreten.
So kommt es bei E. coli bei einem generellen Mangel an Substraten oder bei einem Phosphatmangel zu einem sehr starken Abbau von Ribosomen und damit auch von riboso-

maler RNA. Die hierbei anfallenden Nucleotide werden zu Nucleosiden bzw. Basen degradiert und dann als solche ausgeschieden (Maruyama et al., 1970a und 1970b). In wesentlich geringerem Umfang werden die seltenen Basen abgebaut. Hier blockieren die Substituenten am Purin- bzw. Pyrimidinring einzelne enzymatische Reaktionen. Die Folge ist dann eine Ausscheidung dieser Stoffe durch die Zelle.

Der Basidiomycet QM 806 ist als sehr aktiver Bildner von extrazellulären Enzymen ein biologisch und technisch interessanter Mikroorganismus. Er sezerniert insbesondere Glucanasen (Amylase, Cellulasen und ß-1,3-Glucanase) (Reese und Mandels, 1959) und Proteasen (Friebe, 1973). Hierbei kann bis zu einem Drittel des zellulären Proteins in extrazelluläre Enzyme umgewandelt werden. Parallel zur Ausscheidung der extrazellulären Enzyme wird eine sehr hohe Ausscheidung von UV-absorbierenden Substanzen beobachtet. Die Natur und der Bildungsweg dieser Substanzen wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

## II. MATERIAL

### 1. Chemikalien

BOEHRINGER Mannheim GmbH:
3'-AMP, 3'-CMP, 3'-GMP, 3'-UMP
Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin
Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil
alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.) aus Kälberdarm
Purinnucleosidphosphorylase (EC 2.4.2.1.) aus Kalbsmilz
Adenosindesaminase (EC 3.5.4.4.) aus Kälberdarm
Guanase (EC 3.5.4.3.) aus Kaninchenleber
Xanthin-Oxydase (EC 1.2.3.2.) aus Kuhmilch
Glucose-Peroxidase-System

MILLIPORE Corporation, Bedford, Massachusetts:
Membranfilter, Typ SLHA, Porengröße 0,45 µm

PACKARD Instrument GmbH, Frankfurt/Main
2,5-Diphenyloxazol (PPO)
1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP)

PHARMACIA Fine Chemicals AB. Uppsala, Schweden:
Sephadex G-10

SIGMA Chemical Company, St. Louis (Mo) USA:
3'-Nucleotidase (EC 3.1.3.6.) aus Roggen
5'-Nucleotidase (EC 3.1.3.5.) aus Crotalus adamenteus

THE RADIOCHEMICAL CENTRE Amersham, England:
[2-$^{14}$C] Uracil (62 mCi/mmol)
[U-$^{14}$C] Adenin (286 mCi/mmol)

WHATMAN Inc. Clifton, New Jersey USA:
DEAE Cellulose, Typ DE-52 (vorgequollen)
Chromatographiepapier (I und III MM)

MERCK AG Darmstadt:
Alle übrigen Chemikalien, soweit erhältlich p.a. oder "reinst".

## 2. Pilz- und Bakterienstämme

Der in der vorliegenden Arbeit benutzte Pilzstamm ist der Basidiomycet QM 806, den E. T. Reese, Mycology Laboratory, Pionieering Research Division, U.S. Army Laboratories, Natrick/Massachusetts 01760, freundlicherweise zur Verfügung stellte.

Die Bakterienstämme
E. coli ATCC 11303 (Wildtyp),
E. coli ATCC 12632 (pyrimidinbedürftig),
E. coli ATCC 13473 (purinbedürftig) und
Staph. aureus W 1194 (antibiotikasensibel)
werden zur Charakterisierung der vom Basidiomyceten QM 806 ausgeschiedenen UV-absorbierenden Metabolite benutzt. Der Staph. aureus W 1194 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. U. Winkler zur Verfügung gestellt.

## 3. Nährmedien

### 3.1. Flüssigmedium nach Reese und Mandels

Lösung 1: 20,0 g Glucose ad 100 ml $H_2O$
Lösung 2: 3,0 g $CaCl_2$ ad 100 ml $H_2O$
Lösung 3: 2,0 g $KH_2PO_4$
1,4 g $(NH_4)_2SO_4$
0,3 g Harnstoff
0,3 g $MgSO_4$
ad 100 ml $H_2O$
Lösung 4: Spurenelemente
0,500 g $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,196 g $MnSO_4 \cdot H_2O$
0,200 g $CoCl_2$
0,177 g $ZnCl_2$
ad 100 ml $H_2O$
Lösung 5: 0,1 g Hefe-Extrakt ad 850 ml $H_2O$

Die Lösungen werden getrennt autoklaviert (15 min; 1,2 atü) und nach dem Erkalten gemischt:

850 ml Lösung 5
100 ml Lösung 3
50 ml Lösung 1
10 ml Lösung 2
1 ml Lösung 4

3.2. NB-Medium

8,0 g Nutrient broth (NB)
4,0 g NaCl
ad 1000 ml $H_2O$
Das Medium wird 15 min bei 1,2 atü autoklaviert

3.3. Glycerin-Minimalmedium (M9-Gly)

Lösung 1: 25,0 g Glycerin ad 500 ml $H_2O$
Lösung 2: 2,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ ad 100 ml $H_2O$
Lösung 3: 0,2 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ ad 100 ml $H_2O$
Lösung 4: $H_2O$
Lösung 5: 35,0 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$
15,0 g $KH_2PO_4$
2,5 g NaCl
5,0 g $NH_4Cl$
ad 500 ml $H_2O$
Die Lösungen werden gesondert autoklaviert (15 min; 1,2 atü) und nach dem Erkalten gemischt:

750 ml Lösung 4
100 ml Lösung 1
100 ml Lösung 5
10 ml Lösung 2
10 ml Lösung 3

Supplementiertes M9-Gly-Medium besteht aus 970 ml M9-Gly-Medium und 5 ml NB-Medium.

Die festen Nährmedien enthalten 15 g Agar in 1000 ml Medium.

## III. METHODEN

### 1. Kultur der Organismen

#### 1.1. Kultur des Basidiomyceten QM 806

Die Kultivierung des Basidiomyceten QM 806 erfolgt bei 28°C im Flüssigmedium nach Reese und Mandels (II.3.1.). Das geschieht entweder in Erlenmeyerkolben auf dem Reziprokschüttler (90 Schwingungen/min) oder im Fermenter (Chemap AG; Typ GF 014 - 14 l) mit ca. 10 l Medium (500 - 1000 Upm, Belüftung 15 l/min). Die Kulturdauer beträgt 12 - 14 Tage.

#### 1.2. Kultur der Bakterien

Die Bakterien werden bei 37°C kultiviert. Flüssigkulturen werden auf dem Reziprokschüttler (90 Schwingungen/min) inkubiert.
20 ml NB-Medium (in 100 ml Erlenmeyerkolben) werden mit den Bakterien beimpft und 12 - 15 Stunden inkubiert (= Übernachtkulturen).
Für die "Fütterungsversuche" werden 50 ml M9-Gly-Medium (II.3.3.) in 250 ml Klettkolben mit 0,1 ml der Übernachtkultur beimpft. Für den Plattendiffusionstest werden je 0,2 ml Übernachtkultur der Testorganismen auf NB-Agar-Platten (II.3.2.) mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Auf die getrockneten Platten werden die mit Antibiotika oder den Testsubstanzen getränkten Filterblättchen gelegt. Nach 2 h Aufbewahrung im Kühlschrank werden die Platten bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgt am nächsten Tag.

### 2. Gewinnung des Untersuchungsmaterials vom Basidiomyceten QM 806

Die Pilzkulturen werden 15 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Überstand (=extrazelluläres Material) und das Sediment (=Mycel) werden getrennt weiterverarbeitet.

Im Überstand wird die optische Dichte bei 260 nm bestimmt und zur Isolierung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite wird der Überstand am Rotationsverdampfer auf 1/10 des Volumens eingeengt. Die dabei auftretende Trübung wird durch Ultrafiltration entfernt. Das Sediment (=Mycel) von 100 ml Kultur wird nach zweimaligem Waschen mit $H_2O$ in 8 ml $H_2O$ aufgenommen und mit dem Ultra-Turrax aufgeschlossen. Durch Nachwaschen erhöht sich das Gesamtvolumen auf 12 ml. Dieser Mycelaufschluß wird in drei Fraktionen aufgeteilt:

a) zur Bestimmung des Trockengewichtes werden 2,5 ml des Mycelaufschlusses bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Das Trockengewicht wird in mg/100 ml Kultur angegeben.

b) zur Bestimmung der säurelöslichen Metabolite werden 8 ml des Mycelaufschlusses mit 8 ml 12 % TCA versetzt und zentrifugiert. Das Sediment wird mit 10 % TCA extrahiert und erneut zentrifugiert. In den Überständen (=säurelösliche Metabolite) wird die Extinktion bei 260 nm gemessen. 10 $O.D._{260}$-Einheiten entsprechen ungefähr 1 µmol/ml.

c) das Sediment wird nach TCA-Behandlung mit 2 ml Perchlorsäure (1 mol/l) versetzt und 20 min bei 70°C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min bei 30 000 x g) wird im Überstand der Gehalt an DNA und RNA bestimmt (III.3.2.3. und III.3.2.4.).

## 3. Methoden zum Nachweis und zur Charakterisierung der UV-absorbierenden Substanzen

### 3.1. Chromatographische Methoden

#### 3.1.1. Gelchromatographie an Sephadex G-10

Das Sephadex G-10 Material wird in $H_2O$ suspendiert, über Nacht gequollen und an einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Suspension wird in Chromatographiesäulen (1,5 cm x 100 cm = "kleine" Säule und 5 cm x 120 cm = "große" Säule) gefüllt und mit $H_2O$ gespült.

2 ml ("kleine"Säule) bzw. 20 ml ("große" Säule) des konzentrierten Kulturüberstandes (III.2.) werden auf die Säule aufgetragen und mit $H_2O$ eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 14 ml/h bzw. 110 ml/h. Das Eluat wird in Fraktionen zu 3 ml bzw. 14 ml gesammelt und die $O.D._{260}$ der einzelnen Fraktionen im Zeiss-Spektralphotometer (PM Q II) gemessen. Die Fraktionen der einzelnen Gipfel werden vereinigt und lyophilisiert.

3.1.2. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Die vorgequollene mikrogranuläre DEAE-Cellulose wird in Ammoniumformiat-Puffer (0,3 mol/l; pH 4,4) suspendiert. Anschließend wird die Aufschwemmung mit konzentrierter Ameisensäure auf pH 4,4 gebracht. Die feinen Granula werden nach 10 min durch Dekantieren entfernt. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Dann wird das Harz in Ammoniumformiat-Puffer (0,003 mol/l; pH 4,4) suspendiert. Dieser letzte Schritt wird so lange wiederholt, bis das Filtrat des Überstandes die gleiche Leitfähigkeit und den gleichen pH-Wert wie der Puffer hat. Das so vorbereitete Harz wird in die Glassäule (2,5 cm x 30 cm) gegeben. Die Säule wird mit 5 Volumina des Ammoniumformiat-Puffers (0,002 mol/l; pH 4,4) äquilibriert. Die lyophilisierte Probe wird in 2 ml Ammoniumformiat-Puffer gelöst und mit einem linearen Konzentrationsgradienten bei pH 4,4 eluiert. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 15 ml/h. Das Eluat wird in Fraktionen zu 3 ml gesammelt und die UV-Absorption jeder Fraktion im Zeiss-Spektralphotometer (PM Q II) gemessen. Die Fraktionen der einzelnen Gipfel werden vereinigt und im Rotationsverdampfer eingeengt. Die Säule wird durch 3 Säulenvolumina des Ammoniumformiat-Puffers (2 mol/l; pH 4,4) und durch 5 Säulenvolumina des Puffers (0,003 mol/l; pH 4,4) regeneriert.

3.1.3. Dünnschicht- und Papierchromatographie

Die Auftrennung der UV-absorbierenden Metabolite erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie. Als Schichtmaterial dient Cellulose. Es werden folgende Fließmittel verwendet:

1. Methanol - Äthanol - 32% Salzsäure - $H_2O$ 50+25+6+19 (Kirby, 1955).
2. n-Propanol - 25% Ammoniak - $H_2O$ 60+30+10 (Pataki, 1967)
3. gesättigte Ammoniumsulfatlsg - Na-Acetatlsg (1 mol/l) - Isopropanol 80+18+2 (Neu und Heppel, 1964).

Purine und Pyrimidine sind aufgrund ihrer charakteristischen UV-Absorption mit UV-Licht (254 nm) auf der Dünnschicht nachweisbar.

Die Auftrennung der Zucker auf Cellulose geschieht mit

4. n-Butanol - Eisessig - $H_2O$ 60+20+20

und auf Kieselgel mit

5. n-Butanol - Aceton - $H_2O$ 40+50+10

Die analytische Papierchromatographie (Whatman I) wird mit

6. n-Butanol - Äthanol - $H_2O$ 40+10+10 (Spiro, 1960)

durchgeführt und die präparative Papierchromatographie (Whatman III MM) mit

7. n-Butanol - Äthanol - $H_2O$ 100+10+20 (Spiro, 1960).

Zur Isolierung der Zuckerkomponente nach saurer und enzymatischer Hydrolyse durch präparative Papierchromatographie wird das Hydrolysat strichförmig aufgetragen und in Fließmittel 7 entwickelt. Auf den abgeschnittenen Seitenstreifen des Chromatogramms wird die Position der Zucker bestimmt. Aus dem entsprechenden Mittelteil des Chromatogramms wird der Zucker mit $H_2O$ eluiert und das Eluat lyophilisiert.

Zum Nachweis der Zucker werden die getrockneten Chromatogramme mit Anilinphthalat besprüht und 5 min auf 100°C erhitzt, um die Farbe zu entwickeln (Partridge, 1949).

Für die Dünnschichtchromatographie wird die aufsteigende und für die Papierchromatographie die absteigende Methode verwendet.

### 3.2. Analytisch-chemische Methoden

#### 3.2.1. Sprühreagenz zum Nachweis von Zuckerphosphaten

nach Hanes und Isherwood (1949). Nach der Dünnschichtchromatographie wird die Schicht mit saurer Molybdatlösung besprüht. Phosphathaltige Verbindungen reagieren zu einer intensiv blauen Komponente (Molybdänblau).

#### 3.2.2. Phosphatbestimmung

Die Bestimmung von anorganischem und organisch gebundenem Phosphat erfolgt nach der Methode von Fiske und SubbaRow (1925). Als Standard werden Nucleosidmonophosphate benutzt.

#### 3.2.3. Desoxyribosebestimmung

Die Bestimmung der Desoxyribose erfolgt nach der Methode von Dische in der Modifikation von Burton (1956). Diese Methode dient auch der Bestimmung von DNA. Bei der Auswertung muß berücksichtigt werden, daß pyrimidingebundene Desoxyribose nicht reagiert.

#### 3.2.4. Pentosebestimmung

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode von Mejbaum (1939) mit 45 min Inkubation im kochenden Wasserbad (Albaum und Umbreit, 1947).
Diese Methode eignet sich auch zur Bestimmung von Ribose in gebundener Form wie sie in den Nucleotiden und in der RNA vorliegt. Bei der Auswertung muß berücksichtigt werden, daß pyrimidingebundene Ribose nicht reagiert.

### 3.2.5. Glucosebestimmung

Die Bestimmung der Glucose geschieht mit Hilfe des Glucoseoxidase-Peroxidase-Systems nach Boehringer.

### 3.2.6. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen erfolgen nach der Methode von Lowry et al. (1951). Eine Eichkurve wird mit Rinder-Serum-Albumin aufgenommen. Für 1 mg Protein ergibt sich bei 750 nm eine Extinktion von 3,00 bei der Schichtdicke d = 1,0 cm.

### 3.2.7. Isolierung des Zuckers und der Base aus Nucleosiden nach saurer Hydrolyse

Die N-glykosidische Bindung von Purinnucleosiden kann durch saure Hydrolyse gespalten werden. Es werden ca. 50 $O.D._{260}$-Einheiten der Nucleoside in 2 ml $H_2O$ gelöst und mit 2 ml HCl (2 mol/l) versetzt. Anschließend wird die Probe 30 min im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Zur Isolierung der Base wird das Hydrolysat auf die "kleine" Sephadex G-10 Säule aufgetragen und mit $H_2O$ eluiert. Das Eluat wird durch einen UV-Monitor geleitet und in Fraktionen zu 3 ml gesammelt. Die Fraktionen, deren $O.D._{260}$ größer als eins ist, werden vereinigt und lyophilisiert.
Zur Isolierung des Zuckers wird vom Hydrolysat eine präparative Papierchromatographie (III.3.1.3., Fließmittel 7) durchgeführt.

## 3.3. Spektroskopische Methoden

### 3.3.1. UV-Spektren

Basen wie auch die anderen monomeren Bausteine der Nucleinsäuren können durch ihre charakteristischen UV-Spektren identifiziert werden (Beaven et al., 1955). Die UV-Spektren der Proben werden in HCl (0,1 mol/l) und in NaOH (0,1 mol/l) mit dem Cary-Spektralphotometer (Modell 15) gemessen.

### 3.3.2. Massenspektren

Für die Massenspektren findet das Massenspektrometer Varian CH 15 Verwendung.

## 3.4. Isotachophorese

Hierfür wird die Kapillar-Isotachophorese, Modell IP-1B mit Potential Gradienten-Detektor von Shimadzu benutzt. Die Proben sind wässrige Lösungen der 3'-Nucleotide.
Leition: HCl (0,01 mol/l), ß-Alanin und 0,05 % Polyvinylalkohol
Folgeion: Capronsäure (0,01 mol/l)
Kapillarlänge: 20 cm

## 3.5. Enzymatische Methoden

### 3.5.1. Phosphatasen und Nucleotidasen

Folgende Enzyme werden zur Charakterisierung phosphorylierter Verbindungen benutzt:
a) alkalische Phosphatase
b) 3'-Nucleotidase
c) 5'-Nucleotidase
Es werden ca. 10 $O.D._{260}$-Einheiten der Nucleotide mit 0,2 ml Triäthylaminformiatpuffer (0,1 mol/l; pH 7,5) und 10 µl der entsprechenden Enzymlösungen versetzt und 6 h bei 37°C inkubiert. Nach kurzem Erhitzen auf 100°C wird von den einzelnen Ansätzen eine Dünnschichtchromatographie in Fließmittel 1 und 2 (III.3.1.3.) durchgeführt.

Zur präparativen Isolierung der Nucleoside werden ca. 50 $O.D._{260}$-Einheiten der Nucleotide mit 2 ml Triäthylaminformiatpuffer (0,1 ml/l; pH 7,5) und 10 µl alkalischer Phosphatase versetzt und 6 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen für 5 min auf 100°C abgestoppt und zentrifugiert. Der Überstand wird auf die "kleine" Sephadex G-10 Säule aufgetragen und mit $H_2O$ eluiert. Das Eluat wird durch einen UV-Monitor geleitet und in Fraktionen zu 3 ml gesammelt. Die Fraktionen, deren $O.D._{260}$ größer als eins ist, werden vereinigt und lyophilisiert.

### 3.5.2. Purin- und Pyrimidinnucleosidphosphorylasen

Die Nucleosidphosphorylasen werden für die enzymatische Hydrolyse der Nucleoside in Zucker und Base verwendet. Man unterscheidet zwischen der Purinnucleosidphosphorylase, die alle Purinnucleoside spaltet und der Pyrimidinnucleosidphosphorylase, die spezifisch mit Uridin und Thymidin, aber nicht mit Cytidin reagiert.
Nucleosidphosphorylasen katalysieren folgende reversible Reaktion:

$$\text{Nucleosid} + P_i \rightleftharpoons \text{Ribose-1-P} + \text{Base}$$

Anstelle der Phosphorolyse wird in diesem Versuch die Arsenolyse durchgeführt. Das entstehende Ribose-1-Arsenat wird sehr rasch hydrolysiert und damit die Bildung von Ribose und Base begünstigt.
Es werden ca. 50 $O.D._{260}$-Einheiten der Nucleoside mit 2 ml Arsenolysepuffer (Na-Arsenat, 0,05 mol/l; Na-Succinat, 0,06 mol/l; pH 7,6) und 10 µl Enzymlösung versetzt und 1 h bei 30°C inkubiert. Als Pyrimidinnucleosidphosphorylase wird der Rohsaft von E. coli eingesetzt (III.4.). Nach der Inkubation wird der Ansatz zum Abstoppen gekocht und zentrifugiert.
Zur Isolierung der Base wird der Überstand auf die "kleine" Sephadex G-10 Säule aufgetragen und mit $H_2O$ eluiert. Das Eluat wird durch einen UV-Monitor geleitet und in Fraktionen zu 3 ml gesammelt. Die Fraktionen, deren $O.D._{260}$ größer als eins ist, werden vereinigt und lyophilisiert.
Zur Isolierung des Zuckers wird vom Überstand eine präparative Papierchromatographie in Fließmittel 7 durchgeführt (III.3.1.3.).

### 3.5.3. Nachweis von Adenin mit der Xanthin-Oxidase

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode von Näher (1974).

3.5.4. Nachweis von Guanin mit der Guanase

Guanin wird durch die Guanase spezifisch zu Xanthin desaminiert. Die Guanase ist sehr spezifisch für Guanin.

$$\text{Guanin} + H_2O \xrightarrow{\text{Guanase}} \text{Xanthin} + NH_3$$

Guanin und Xanthin haben unterschiedliche UV-Spektren. Der Abbau von Guanin zu Xanthin kann also aufgrund des Absorptionsspektrums nachgewiesen werden.
1,5 ml Probe bzw. Guaninlösung (0,002 mol/l) werden mit 1,5 ml Triäthylaminformiatpuffer (0,1 mol/l; pH 7,5) und 10 ul Guanaselösung versetzt. Der Ansatz wird 20 min bei 30°C inkubiert. Von den Proben wird vor und nach Enzymbehandlung ein UV-Spektrum geschrieben.

3.5.5. Nachweis von Cytidin mit der Cytidindesaminase

Die Bestimmung erfolgt nach der Methode von Förster und Holldorf (1974).
2 ml Probe bzw. Cytidinlösung (0,1 - 0,5 mmol/l) werden mit 0,6 ml Diäthylaminpuffer (0,2 mol/l; pH 9,2) und 0,4 ml $MgCl_2$ (0,1 mol/l) versetzt, gut gemischt und die Extinktion abgelesen bis sie konstant bleibt.
Dann werden 20 µl Cytidindesaminaselösung zugegeben, gemischt und die Extinktion nach 10, 20 und 30 min abgelesen. Wenn keine Extinktionsänderung mehr eintritt, wird der Endwert abgelesen. Als Enzym dient ein Rohsaft von E. coli, in dem die Pyrimidinnucleosidphosphorylase und die Cytidindesaminase induziert wurden (III.4.).

4. Gewinnung des Rohsaftes aus E. coli-Zellen mit Pyrimidinnucleosidphosphorylase- und Cytidindesaminaseaktivität

Zellen von E. coli (ATCC 11303) werden auf M9-Gly-Medium (II.3.3.) mit Cytidin (1 mmol/l) als Induktor inkubiert. Gegen Ende der exponentiellen Phase werden die Bakterien abgeerntet und die Zellen mit Aluminiumoxid (Alcoa A 305) aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wird in Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l; pH 7,4) aufgenommen und Zelltrümmer und

Aluminiumoxid werden abzentrifugiert. Der Überstand (=Rohsaft) wird über Nacht gegen Tris-HCl-Puffer dialysiert. Das Enzym wird bei 75% Ammoniumsulfatsättigung gefällt und das Präzipitat in Tris-HCl-Puffer (0,05 mol/l; pH 7,4) gelöst und anschließend gegen den Puffer dialyliert. Dieser Rohsaft dient zur Spaltung der Pyrimidinnucleoside und zum Nachweis von Cytidin.

5. Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806

Die Kultivierung des Pilzes erfolgt in 100 ml Flüssigmedium nach Reese und Mandels (II.3.1.) in 500 ml Erlenmeyerkolben bei 30°C (III.1.1.). Zu Beginn des Wachstums werden 20 uCi $^{14}$C-Adenin bzw. $^{14}$C-Uracil und kaltes Adenin bzw. Uracil (60 µmol) dem Kulturmedium zugesetzt.

Zur Bestimmung der Radioaktivität im Kulturmedium werden Proben von 2 ml entnommen und 15 min bei 6000 x g zentrifugiert. 0,5 ml des Überstandes werden mit 0,5 ml 10% TCA versetzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 6000 x g werden 0,1 ml des Überstandes zu 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben.

Zur Bestimmung der Verteilung der Radioaktivität werden 100 ml Kultur aufgearbeitet wie unter III.2. angegeben. Es werden jeweils 0,1 ml der säurelöslichen Metabolite und des Perchlorsäureextraktes (säureunlösliches Material) mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die zu Kulturbeginn zugesetzte Radioaktivität wird gleich 100% gesetzt.

Die Messung der Ausscheidung von $^{14}C\text{-}CO_2$ geschieht in einer Warburgapparatur durch Adsorption des $CO_2$ von einer 20% KOH. Aus einem 100 ml Kulturansatz werden in verschiedenen Wachstumsphasen des Pilzes 15 ml im Warburggefäß bei 28°C 2 - 3 Tage weiter inkubiert. Es werden jeweils 0,05 ml der KOH (Gesamtvolumen 2,5 ml) mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt.

Die Radioaktivität der Proben wird im Packard Flüssigkeitsszintillationszähler (TRI-CARB Modell 3380) gezählt. Die verwendete Szintillationsflüssigkeit hat folgende Zusammensetzung:

5,5 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO)
0,1 g 1,4-bis-2-(4'Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP)
667 ml Toluol
333 ml Triton X-100

# IV. ERGEBNISSE

## 1. Wachstumsverhalten des Basidiomyceten QM 806

Die Anzucht des Basidiomyceten QM 806 erfolgt im Fermenter (III.1.1.). Zu den in Abb. 1 angegebenen Zeiten werden Proben von jeweils 100 ml entnommen. In diesen Proben wird das Myceltrockengewicht als Maß für das Wachstum des Pilzes bestimmt. Abb. 1 zeigt, daß das Trockengewicht nach 8 Tagen einen Maximalwert erreicht, dann wieder abfällt und schließlich auf einem konstanten Wert bleibt, der etwa 1/3 unter dem Maximalwert liegt. Verfolgt man die Glucoseabnahme im Medium, so zeigt sich, daß das Maximum des Trockengewichtes zeitlich mit dem Verbrauch der angebotenen Glucose zusammenfällt. Nach 9 Tagen ist keine Glucose mehr im Kulturmedium nachweisbar. Außerdem wird im Kulturmedium der pH-Wert verfolgt. Zu Beginn der Inkubation liegt der pH-Wert bei 6,2, fällt dann während der Inkubation bis auf pH 2,3 ab und steigt anschließend wieder bis auf pH 6,2 an. Der Verlauf der UV-Absorption im Medium wird durch Messen der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Während des Wachstums erfolgt bis zum 9. Tag eine Zunahme der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Nach Erreichen dieses Maximalwertes nimmt die UV-Absorption wieder ab, bis ein konstanter Wert erreicht wird, der 1/3 unter dem maximalen Wert liegt.

## 2. UV-Spektren des Kulturfiltrates zu verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806

Vom Kulturfiltrat einiger Proben aus Versuch 1 (Abb. 1) werden UV-Spektren (III.3.3.1.) geschrieben (Abb. 2). Dazu werden die Proben vom 7. - 10. Tag 1 : 10 mit $H_2O$ verdünnt. Die einzelnen Spektren aus den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 sind identisch. Das bedeutet, daß während des Wachstums des Pilzes die

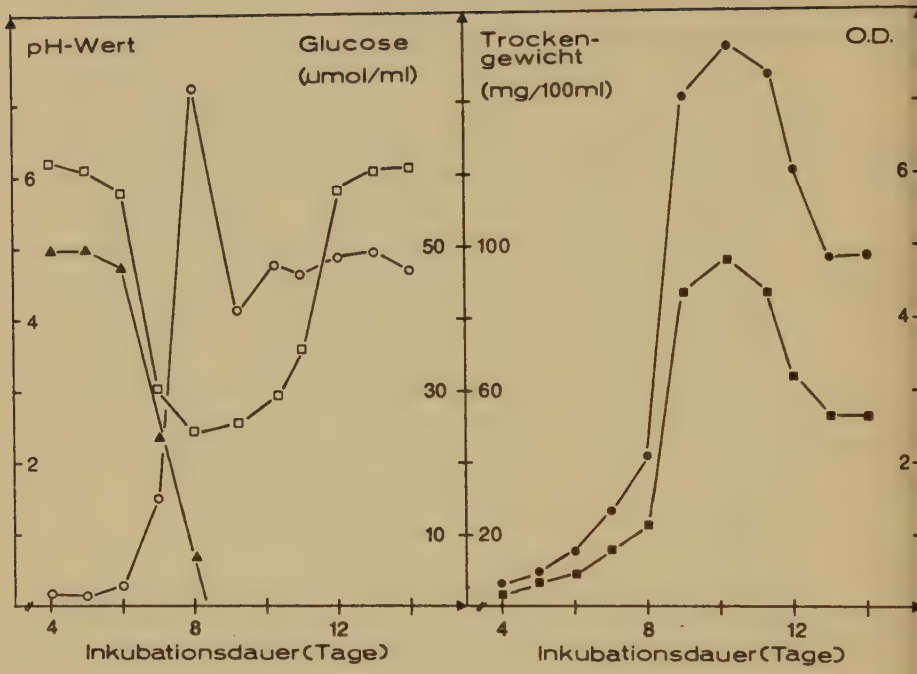



Abb. 1: Verlauf des Trockengewichtes ( o—o—o—o ),
der Glucosekonzentration (▲—▲—▲—▲),
der Absorption bei 260 nm ( ●—●—●—● )
und bei 280 nm ( ■—■—■—■ )
und des pH-Wertes ( □—□—□—□ )
im Kulturmedium während des Wachstums des
Basidiomyceten QM 806.

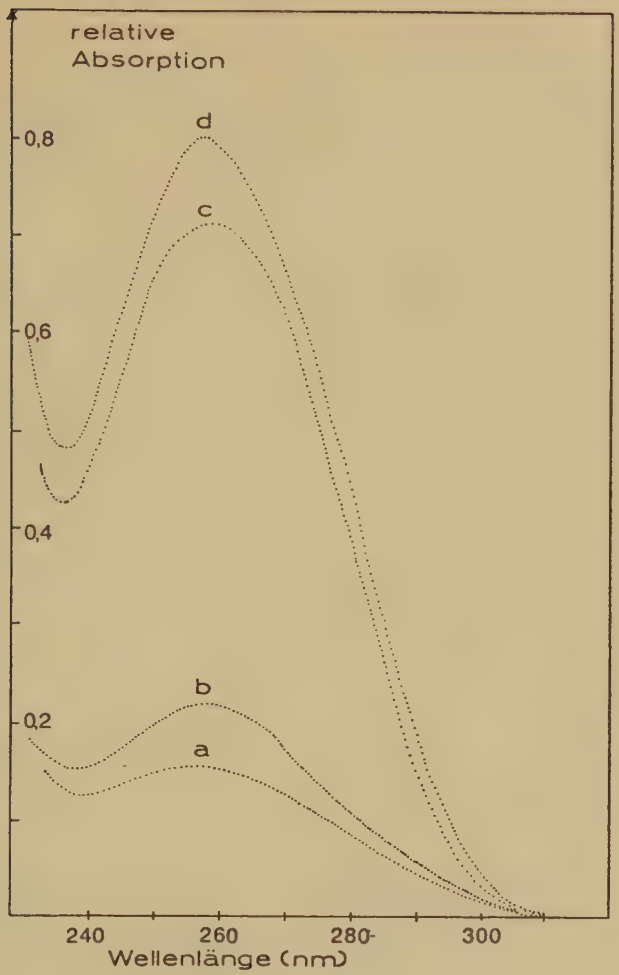



Abb. 2: UV-Spektren des mit $H_2O$ 1 : 10 verdünnten Kulturfiltrats aus den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 (siehe Abb. 1).

Kurve a = 7. Inkubationstag
Kurve b = 8. Inkubationstag
Kurve c = 9. Inkubationstag
Kurve d = 10. Inkubationstag

UV-Absorption im Kulturfiltrat immer von den gleichen Metaboliten verursacht wird. Der Verlauf der Spektren gibt einen Hinweis, daß es sich hier um Purin- und/oder Pyrimidinverbindungen handelt.

3. Zusammensetzung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite in den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806

In diesem Versuch wird die Zusammensetzung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite in den verschiedenen Wachstumsphasen des Pilzes untersucht. Nach Gorbach und Menke (1968) und Wasternak und Reinbothe (1970) eignet sich Sephadex G-10 gut zur Auftrennung von Purin- und Pyrimidinverbindungen, da es neben der Auftrennung nach dem Molekulargewicht noch zu einer reversiblen Adsorption kommt und damit zu einer Retardierung der heterocyclischen Substanzen.
Der Pilz wird im Fermenter (III.1.1.) gezüchtet. Zu den in Abb. 3a angegebenen Zeiten werden Proben von jeweils 60 ml entnommen und bei 6000 x g zentrifugiert. Vom Kultturüberstand wird die optische Dichte bei 260 nm bestimmt. Es werden jeweils 50 ml des Kulturüberstandes lyophilisiert, anschließend in 2,5 ml $H_2O$ aufgenommen, auf die "kleine" Sephadex G-10 Säule aufgetragen und mit $H_2O$ eluiert. Die Elutionsdiagramme der durch Pfeile markierten Proben (Abb. 3a) geben die Abb. 3b, 3c und 3d wieder. Die dargestellten Diagramme zeigen, daß der Basidiomycet QM 806 mehrere UV-absorbierende Metabolite in das Kulturmedium ausscheidet. Diese UV-absorbierenden Metabolite lassen sich in jedem Wachstumsstadium in vier Hauptgipfel auftrennen. In ihrer Gesamtheit enthalten sie 90 - 95 % der jeweils aufgetragenen $O.D._{260}$-Einheiten. Die nicht wiedergegebenen Zwischenwerte ergeben entsprechende Elutionsdiagramme. Die Hauptgipfel werden mit 1, 2a, 2b und 3 bezeichnet. Ihre Gesamtmenge

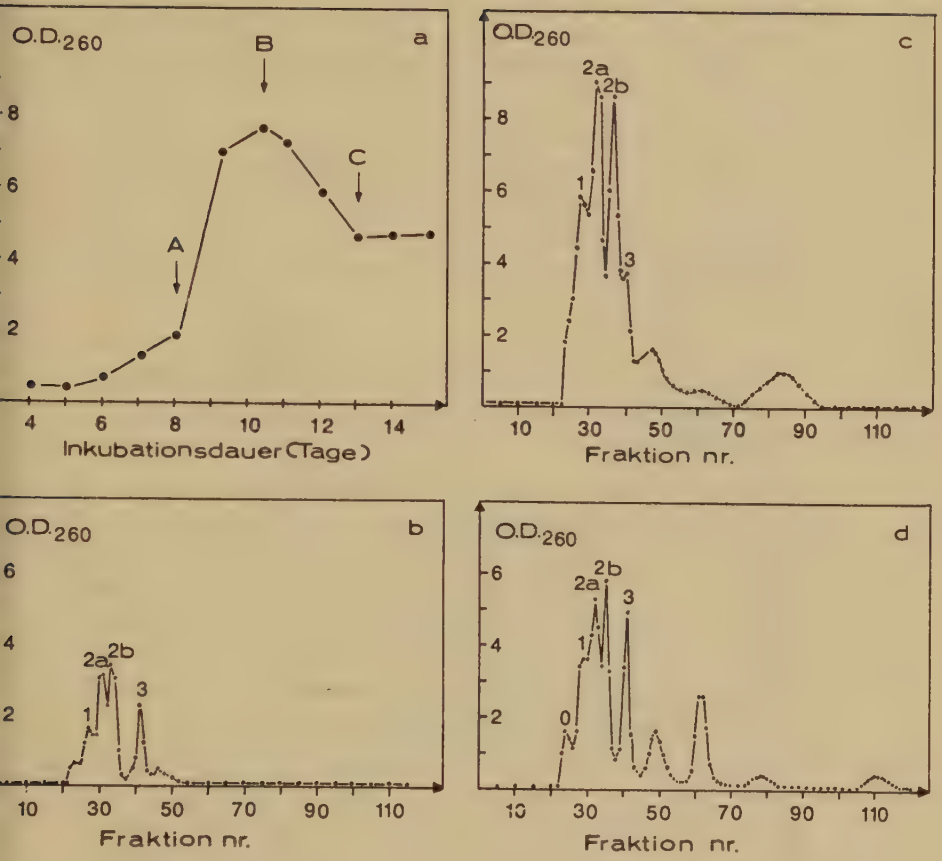



Abb. 3: a) O.D.$_{260}$ des Kulturfiltrats während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806.

Säulenchromatographische Auftrennung des Kulturfiltrates des Basidiomyceten QM 806 an Sephadex G-10 (kleine Säule; Fraktionsvolumen: 3 ml) zu den in Abb. 3a angegebenen Zeiten

b) zum Zeitpunkt A
c) zum Zeitpunkt B
d) zum Zeitpunkt C

Bei den Gipfeln in den späteren Fraktionen in Abb. 3c und 3d handelt es sich um Dephosphorylierungsprodukte der Metabolite der Hauptgipfel. Daher werden sie nicht weiter isoliert.

verändert sich zwar während des Wachstums, doch bleibt ihr Verhältnis zueinander in allen Wachstumsphasen annähernd gleich.
In der späteren Wachstumsphase tritt noch ein zusätzlicher Gipfel O auf, der bei 280 nm eine höhere Absorption zeigt als bei 260 nm. Bei diesem Gipfel handelt es sich um die extrazellulären Enzyme.
Im folgenden sollen die vier Hauptgipfel isoliert und charakterisiert werden.

## 4. Isolierung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite aus dem Kulturfiltrat des Basidiomyceten QM 806

Bevor die UV-absorbierenden Metabolite aus dem Kulturfiltrat isoliert werden, wird geprüft, ob sie dort in einer stabilen Form vorliegen. Dazu werden zu verschiedenen Inkubationszeiten Proben entnommen und das Mycel durch Ultrafiltration entfernt. Die zellfreien Kulturfiltrate werden weiterhin bei 30°C inkubiert und die Absorption bei 260 nm verfolgt (Abb. 4). In allen untersuchten zellfreien Proben bleibt die Absorption bei 260 nm über einen längeren Zeitraum annähernd konstant.
Zur Isolierung der extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite aus dem Kulturfiltrat des Basidiomyceten QM 806 wird der Pilz im Fermenter (III.1.1.) bis zum Erreichen der höchsten UV-Absorption kultiviert und dann abgeerntet.

### 4.1. Gelchromatographie an Sephadex G-10

20 ml des konzentrierten Kulturüberstandes (III.2.) werden auf die "große" Sephadex G-10 Säule aufgetragen (III.3.1.1.) und mit $H_2O$ eluiert (Abb. 5a).
Die Trennschärfe der "großen" Säule ist geringer als die der "kleinen", so daß nur eine Auftrennung in die drei Gipfel 1, 2 und 3 erfolgt. Die Fraktionen der einzelnen Gipfel werden vereinigt und gefriergetrocknet.

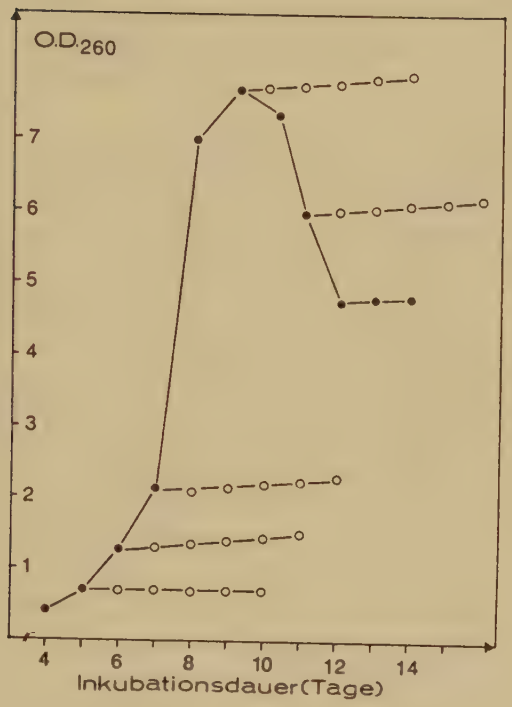



Abb. 4: Verlauf der O.D.$_{260}$ im Kulturmedium während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806 ( ●—●—● ) und Weiterinkubation des zellfreien Kulturfiltrats bei 30°C ( o—o—o ).

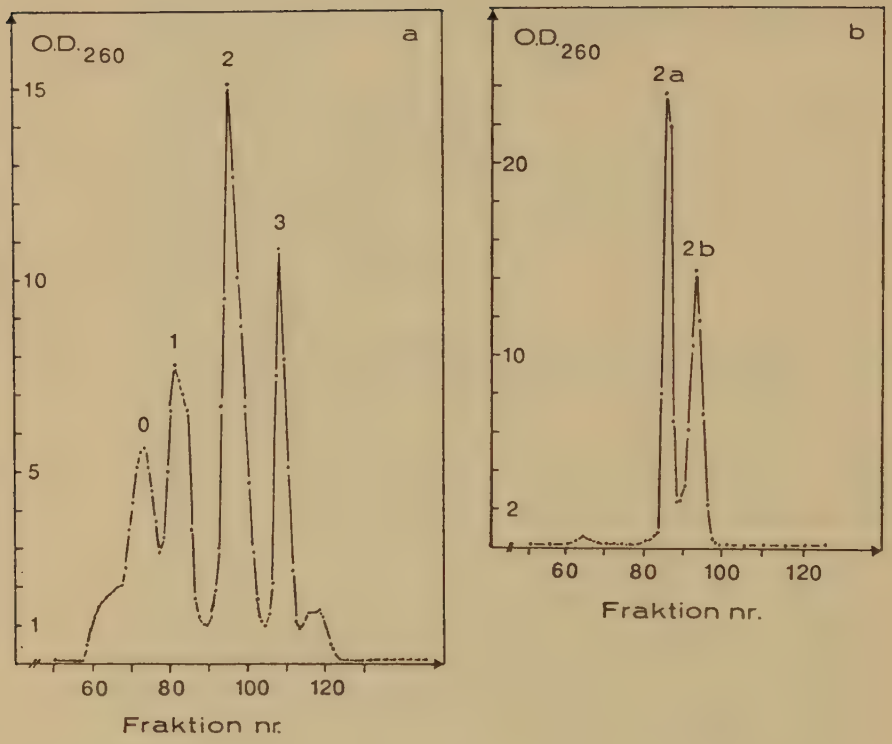



Abb. 5: a) Säulenchromatographische Trennung des Kulturfiltrats des Basidiomyceten QM 806 an Sephadex G-10 ("große" Säule; Fraktionsvolumen: 14 ml)

b) Rechromatographie von Gipfel 2 an Sephadex G-10 ("große" Säule; Fraktionsvolumen: 14 ml).

Eine Rechromatographie von Gipfel 2 auf der "großen" Sephadex G-10 Säule führt zu einer Auftrennung in zwei Gipfel, die den Gipfeln 2a und 2b der "kleinen" Säule entsprechen (Abb. 5b).

4.2. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose

Die DEAE-Cellulose Säule dient der weiteren Reinigung der durch Gelchromatographie an Sephadex G-10 gewonnenen Proben. Vor allem werden in diesem Reinigungsschritt die Salze entfernt.
Die lyophilisierten Gipfel 1, 2a, 2b und 3 nach Chromatographie an Sephadex G-10 werden in Ammoniumformiat-Puffer ( pH 4,4 ) gelöst und mit einem linearen Konzentrationsgradienten (500 ml Ammoniumformiat-Puffer, 0,02 mol/l und 500 ml Ammoniumformiat-Puffer, 0,2 mol/l) bei pH 4,4 eluiert (III.3.1.2.). Bei der Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose ist keine weitere Trennung der Substanzen möglich. Die erhaltenen Gipfel werden am Rotationsverdampfer eingeengt. Bei diesem Schritt werden gleichzeitig Ionen des Elutionspuffers abgedampft, so daß salzfreie Proben erhalten werden. Die isolierten Substanzen ergeben dünnschichtchromatographisch (Fließmittel 1, 2 und 3; III.3.1.3.) jeweils nur eine Zone. Diese dünnschichtchromatographisch reinen Substanzen werden in die folgenden Charakterisierungsschritte eingesetzt.

5. Charakterisierung der UV-absorbierenden Metabolite

Die Spektren des Kulturfiltrats (IV.2.) geben den Hinweis, daß die UV-absorbierenden Metabolite Purin- und/oder Pyrimidinverbindungen sind. Die vier aus dem Kulturfiltrat des Basidiomyceten QM 806 isolierten Metabolite 1, 2a, 2b und 3 zeigen an Sephadex G-10 (Wasernak und Reinbothe, 1970) und an DEAE-Cellulose (Rustum und Schwartz, 1973) das gleiche Elutionsverhalten wie Nuc-

leosidmonophosphate. Die isolierten Metabolite werden deshalb auf ihren Phosphatgehalt und die Position der Phosphatgruppe, Art der Zucker- und Basenkomponente und die Art ihrer Verknüpfung hin untersucht.

## 5.1. Nachweis von Phosphat

In folgenden Versuchen wird eine qualitative und eine quantitative Phosphatbestimmung durchgeführt und enzymatisch die Position der Phosphatgruppe bestimmt.

### 5.1.1. Nachweis von Zuckerphosphaten auf Dünnschichtplatten

Zuerst erfolgt der qualitative Phosphatnachweis. Von den vier isolierten UV-absorbierenden Metaboliten und den Ribonucleosidmonophosphaten als Referenzsubstanzen wird in Fließmittel 1 und 2 (III.3.1.3.) eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Die vier isolierten UV-absorbierenden Metabolite des Basidiomyceten QM 806 zeigen wie die Referenzsubstanzen mit dem Sprühreagenz (III.3.2.1.) eine positive Reaktion (Tab. 1). Die vier fraglichen UV-absorbierenden Metabolite sind also Nucleosidphosphate.

### 5.1.2. Phosphatbestimmung nach Fiske-SubbaRow

Die quantitative Bestimmung des organisch gebundenen Phosphats erfolgt nach Fiske-SubbaRow (III.3.2.2.). Von den einzelnen isolierten Metaboliten werden 10 $O.D._{260}$-Einheiten in den Test eingesetzt. Nach dem mittleren molaren Extinktionskoeffizienten ($10 \times 10^3$ l/mol x cm) der Nucleotide entspricht dies ungefähr 1 µmol/ml. Das Ergebnis dieser Phosphatbestimmung (Tab. 1) zeigt, daß bei allen vier untersuchten Proben auf 1 mol isoliertem Metabolit 1 mol Phosphat kommt. DieserVersuch bestätigt, daß die isolierten Verbindungen Nucleosidmonophosphate sind. Die Exaktheit der Bestimmungsmethode wird noch einmal mit Hilfe der Vergleichssub-

| Untersuchte Substanz | Reaktion auf Zuckerphosphat | molares Verhältnis $PO_4^{3-}$/Base |
|---|---|---|
| Metabolit 1 | + | 1,34 |
| Metabolit 2a | + | 1,07 |
| Metabolit 2b | ++ | 0,78 |
| Metabolit 3 | ++ | 0,89 |
| 5'-AMP | ++ | 0,98 |
| 5'-CMP | + | 1,10 |
| 5'-GMP | ++ | 1,12 |
| 5'-UMP | + | 1,01 |

Tab. 1: Nachweis von Phosphat auf der Dünnschichtplatte (III.3.2.1.) und molares Verhältnis von Phosphat zu Base. Die Phosphatbestimmung erfolgt nach Fiske-SubbaRow (III.3.2.2.). Für die isolierten Metabolite wird ein mittlerer Extinktionskoeffizient von 10 x $10^3$l/mol x cm bei 260 nm angenommen und für die 5'-Nucleotide die exakten Extinktionskoeffizienten.

stanzen 5'-AMP, 5'-CMP, 5'-GMP und 5'-UMP überprüft (Tab. 1).

5.1.3. Enzymatische Bestimmung der Position der Phosphatgruppe

Die bisher durchgeführten Versuche zeigen, daß die aus dem Kulturmedium des Basidiomyceten QM 806 isolierten Metabolite Nucleosidmonophosphate sind. Die Position der Phosphatgruppe wird mit folgenden spezifischen Enzymen bestimmt:

a) alkalische Phosphatase
b) 5'-Nucleotidase
c) 3'-Nucleotidase

Die Durchführung erfolgt wie unter III.3.4.1. angegeben. Als Referenzsubstanzen dienen wiederum Nucleosid-3'- bzw. Nucleosid-5'-monophosphate.

| Untersuchte Substanz | $R_F$-Werte | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fließmittel 1 | | | | Fließmittel 2 | | | |
| | ohne Enzym | alk. P'ase | 3'-Nucl. | 5'-Nucl. | ohne Enzym | alk. P'ase | 3'-Nucl. | 5'-Nucl. |
| 5'-AMP | 0,40 | 0,24 | 0,40 | 0,24 | 0,00 | 0,21 | 0,00 | 0,21 |
| 3'-AMP | 0,40 | 0,24 | 0,24 | 0,40 | 0,00 | 0,21 | 0,21 | 0,00 |
| 3'-CMP | 0,53 | 0,40 | 0,40 | 0,53 | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 |
| 3'-GMP | 0,36 | 0,24 | 0,24 | 0,36 | 0,00 | 0,16 | 0,16 | 0,00 |
| 3'-UMP | 0,64 | 0,56 | 0,56 | 0,64 | 0,00 | 0,09 | 0,09 | 0,00 |
| Metabolit 1 | 0,54 | 0,42 | 0,42 | 0,54 | 0,00 | 0,14 | 0,14 | 0,00 |
| Metabolit 2a | 0,64 | 0,55 | 0,55 | 0,64 | 0,00 | 0,11 | 0,11 | 0,00 |
| Metabolit 2b | 0,42 | 0,26 | 0,26 | 0,42 | 0,00 | 0,21 | 0,21 | 0,00 |
| Metabolit 3 | 0,37 | 0,25 | 0,25 | 0,37 | 0,00 | 0,05 | 0,05 | 0,00 |

Tab. 2: $R_F$-Werte aus der Dünnschichtchromatographie der einzelnen Substanzen vor und nach enzymatischer Behandlung (III.3.4.1.).
Abkürzungen: alk. P'ase = alkalische Phosphatase
3'-Nucl. = 3'-Nucleotidase
5'-Nucl. = 5'-Nucleotidase

Nach Behandlung mit der alkalischen Phosphatase verändert sich bei den vier isolierten Metaboliten und allen Referenzsubstanzen der $R_F$-Wert im Dünnschichtchromatogramm. In allen Substanzen liegt also ein endständiger Monophosphosäureester vor.
Während 5'-AMP mit der 5'-Nucleotidase eine positive Reaktion zeigt, bleibt eine Inkubation mit 5'-Nucleotidase bei allen übrigen Verbindungen wirkungslos. Die 3'-Nucleotidase dagegen reagiert mit allen 3'-Ribonucleosidmonophosphaten und den vier isolierten Metaboliten. Das ist ein spezifischer Nachweis dafür, daß die aus dem Kulturfiltrat des Basidiomyceten QM 806 isolierten Metabolite Nucleosid-3'-monophosphate sind.

## 5.2. Charakterisierung der Zuckerkomponente

In den folgenden Versuchen wird die Zuckerkomponente der isolierten Metabolite charakterisiert. Da die üblichen Nucleinsäureverbindungen Ribose oder Desoxyribose enthalten, wird geprüft, ob die Zuckerkomponente der isolierten Metabolite Desoxyribose oder Ribose ist, oder ob der Basdiomycet QM 806 seltene Nucleotide mit einer abgewandelten Zuckerkomponente in das Kulturmedium abgibt.

### 5.2.1. Analytisch-chemische Bestimmung der Zuckerkomponente

Von den Metaboliten 1, 2a, 2b und 3 wird eine Desoxyribosebestimmung nach Dische (III.3.2.4.) und eine Pentosebestimmung mit Orcin (III.3.2.4.) durchgeführt. In der Pentosebestimmung mit Orcin zeigen die vier Aldopentosen (Xylose, Arabinose, Lyxose und Ribose) fast identisch Extinktionskoeffizienten. Es sind nur freie Pentosen und puringebundene Pentosen nachweisbar, pyrimidingebundene Pentosen nicht.

Der Dexoxyribosenachweis ist bei allen vier isolierten Metaboliten und der Pentosenachweis mit Orcin bei den Metaboliten 1 und 2a negativ. Bei den Metaboliten 2b und 3 ist das Verhältnis von Base zu Pentose ungefähr 1 : 1 (Tab. 3). Eine genauere Charakterisierung der Zuckerkomponente geschieht mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und Papierchromatographie.

| untersuchte Substanz | molares Verhältnis Pentose/Base |
|---|---|
| Metabolit 1 | 0,07 |
| Metabolit 2a | 0,06 |
| Metabolit 2b | 1,08 |
| Metabolit 3 | 1,01 |
| 3'-AMP | 1,00 |
| 3'-CMP | 0,00 |

Tab. 3: Molares Verhältnis von Pentose zu Base nach der Pentosebestimmung (III.3.2.4.). Für die isolierten Metabolite wird ein mittlerer Extinktionskoeffizient von 10 x $10^3$ l/mol x cm bei 260 nm angenommen und für die 3'-Nucleotide die exakten Extinktionskoeffizienten.

5.2.2. Dünnschicht- und papierchromatographische Bestimmung der Zuckerkomponente nach saurer und enzymatischer Hydrolyse

Für die dünnschicht- und papierchromatographische Analyse der Zuckerkomponente wird der Zucker aus den vier Metaboliten isoliert. Dazu werden die vier isolierten Metabolite zuerst mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert (III.3.4.1.) und die entstehenden Nucleoside durch saure Hydrolyse (III.3.2.5.) und/oder enzymatisch mit der Purin- oder der Pyrimidinnucleosid-

phosphorylase zu Base und Zucker abgebaut (III.3.4.2.). Die Pyrimidinnucleosidphosphorylase katalysiert die phosphorolytische Spaltung von Uridin, aber nicht von Cytidin, und die Purinnucleosidphosphorylase katalysiert die phosphorolytische Spaltung von Purinnucleosiden wie Adenosin, Guanosin, Inosin und ihren Desoxyanalogen. Aus dem Basen-Zucker-Gemisch wird die Zuckerkomponente durch präparative Papierchromatographie in Fließmittel 7 gewonnen (III.3.1.3.). Die Zuckerkomponente der Metabolite 2b und 3 kann nach saurer Hydrolyse und nach Behandlung mit der Purinnucleosidphosphorylase isoliert werden, und die Zuckerkomponente von Metabolit 2a nach Behandlung mit der Pyrimidinnucleosidphosphorylase. Metabolit 1 dagegen kann unter diesen Bedingungen nicht abgebaut werden. Da weder im Pentosenachweis noch in den hier aufgeführten Methoden eine Reaktion mit Metabolit 1 erfolgt, kann es sich hierbei um eine Cytidinverbindung handeln.

Die Identifizierung der isolierten Zuckerkomponenten erfolgt dünnschicht- und papierchromatographisch in den Fließmitteln 4, 5 und 6 (III.3.1.3.). Die isolierten Zuckerkomponenten zeigen in den drei Chromatographie-Verfahren untereinander identische $R_F$-Werte. Die Farbentwicklung mit Anilinphthalat (Sprühreagenz zur Sichtbarmachung der Zuckerkomponenten auf den Chromatogrammen) weist auf Aldopentosen hin. Als Referenzsubstanzen dienen die vier Aldopentosen, Glucose (als Vertreter für Hexosen) und Desoxyribose (als Vertreter für Desoxyzucker).

Die $R_F$-Werte sind in Tab. 4 zusammengefaßt. Die isolierten Zuckerkomponenten zeigen in der Dünnschichtchromatographie in beiden Systemen den gleichen $R_F$-Wert wie Ribose. Auf dem Papierchromatogramm besteht eine geringfügige Abweichung zwischen dem $R_F$-Wert der isolierten Zuckerkomponenten mit dem der Ribose. Alle übrigen Referenzsubstanzen sind davon jedoch noch weiter entfernt.

Aus allen Untersuchungen zur Charakterisierung der Zuckerkomponente kann geschlossen werden, daß die isolierten

UV-absorbierenden Metabolite Ribose als Zucker enthalten.

| aufgetragene Substanz | $R_F$-Werte | | |
|---|---|---|---|
| | A | B | C |
| Glucose | 0,51 | 0,17 | 0,13 |
| Desoxyribose | 0,70 | 0,48 | 0,58 |
| Arabinose | 0,64 | 0,27 | 0,20 |
| Xylose | 0,69 | 0,29 | 0,24 |
| Lyxose | 0,68 | 0,31 | 0,28 |
| Ribose | 0,70 | 0,34 | 0,31 |
| isolierte Zucker-komponenten | 0,70 | 0,34 | 0,30 |

Tab. 4: Dünnschicht- und Papierchromatographie von verschiedenen Zuckern (III.3.1.3.)
A: Dünnschichtchromatographie, Schicht: Kieselgel, Fließmittel 4
B: Dünnschichtchromatographie, Schicht: Cellulose, Fließmittel 5
C: Papierchromatographie, Fließmittel 6

## 5.3. Charakterisierung der Basenkomponente

Die bereits durchgeführten Versuche zeigen, daß die Metabolite 1 und 2a Pyrimidinnucleotide und die Metabolite 2b und 3 Purinnucleotide sind. In den folgenden Versuchen werden die Basenkomponenten der vier aus dem Kulturfiltrat des Basidiomyceten QM 806 isolierten Ribonucleotide untersucht. In die Untersuchungen werden die aus dem Kulturfiltrat direkt isolierten Mononucleotide und die daraus gewonnenen Nucleoside und freien Basen eingesetzt. Zur Isolierung der Nucleoside werden die vier isolierten Metabolite nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase an Sephadex G-10 chromatographiert (III.3.5.1.) Die Nucleoside der Metaboliten 2b und 3 werden mit der

Purinnucleosidphosphorylase (III.3.5.2.) und das Nucleosid von Metabolit 2a wird mit der Pyrimidinnucleosidphosphorylase (III.3.5.2.) abgebaut. Die abgespaltene Base aus dem enzymatischen Ansatz wird durch Chromatographie an Sephadex G-10 gereinigt und isoliert (III. 3.1.1.). Die isolierten Basen werden in den nachfolgenden Versuchen charakterisiert.

### 5.3.1. Dünnschichtchromatographie der Nucleotide, Nucleoside und Basen

In zwei verschiedenen Fließmitteln (Fließmittel 1 und 2; III.3.1.3.) werden die $R_F$-Werte der unbekannten Metabolite bestimmt und mit denen der eingesetzten Referenzsubstanzen (übliche Ribonucleinsäureverbindungen) verglichen (Tab. 5). Danach kann für alle vier unbekannten Metabolite eine recht gute Zuordnung zu den vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil erfolgen und zwar wie folgt:

Metabolit 1 entspricht den Cytosinverbindungen
Metabolit 2a entspricht den Uracilverbindungen
Metabolit 2b entspricht den Adeninverbindungen
Metabolit 3 entspricht den Guaninverbindungen

### 5.3.2. UV-Spektren der Nucleoside und Basen

Die UV-Absorptionsspektren von Purin- und Pyrimidinverbindungen sind gut zur Charakterisierung und Identifizierung geeignet. Die UV-Spektren der Nucleoside und Nucleotide sind identisch. Die charakteristischen Größen der UV-Spektren der isolierten Nucleoside und Basen bei saurem und alkalischem pH-Wert gibt Tab. 6 wieder. Die Auswertung dieser Daten ergibt die gleiche Zuordnung der Metabolite zu den üblichen Ribonucleotiden wie bei den dünnschichtchromatographischen Untersuchungen.

| aufgetragene Substanz | $R_F$-Werte | |
|---|---|---|
| | Fließmittel 1 | Fließmittel 2 |
| Nucleotid 1 | 0,54 | 0,06 |
| Nucleotid 2a | 0,64 | 0,03 |
| Nucleotid 2b | 0,43 | 0,00 |
| Nucleotid 3 | 0,38 | 0,02 |
| 3'-CMP | 0,53 | 0,00 |
| 3'-UMP | 0,64 | 0,02 |
| 3'-AMP | 0,43 | 0,02 |
| 3'-GMP | 0,38 | 0,02 |
| Nucleosid 1 | 0,39 | 0,59 |
| Nucleosid 2a | 0,59 | 0,50 |
| Nucleosid 2b | 0,29 | 0,56 |
| Nucleosid 3 | 0,27 | 0,43 |
| Cytidin | 0,39 | 0,52 |
| Uridin | 0,57 | 0,45 |
| Adenosin | 0,30 | 0,58 |
| Guanosin | 0,26 | 0,41 |
| Base 2a | 0,58 | 0,51 |
| Base 2b | 0,32 | 0,54 |
| Base 3 | 0,08 | 0,34 |
| Cytosin | 0,40 | 0,54 |
| Uracil | 0,59 | 0,51 |
| Adenin | 0,34 | 0,54 |
| Guanin | 0,08 | 0,34 |

Tab. 5: $R_F$-Werte aus der dünnschichtchromatographischen Untersuchung der Nucleotide, Nucleoside und Basen (III.3.1.3.).

| untersuchte Substanz | sauer | | | alkalisch | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $\lambda_{max}$ | $\lambda_{min}$ | $\frac{260nm}{280nm}$ | $\lambda_{max}$ | $\lambda_{min}$ | $\frac{260nm}{280nm}$ |
| Nucleosid 1 | 276 | 239 | 0,60 | 270 | 249 | 1,10 |
| Nucleosid 2a | 259 | 230 | 3,07 | 281 | 241 | 0,79 |
| Nucleosid 2b | 250 | 224 | 3,63 | 254 | 228 | 4,70 |
| Nucleosid 3 | 254 | 226 | 1,47 | 260 | 232 | 1,65 |
| Base 2a | 258 | 235 | 1,80 | 259 | 238 | 1,54 |
| Base 2b | 260 | 239 | 1,81 | 262 | 238 | 1,33 |
| Base 3 | 246 | 224 | 1,20 | 273 | 241 | 0,87 |

Tab. 6: Charakteristische Größen der UV-Spektren der isolierten Nucleoside und Basen bei saurem und alkalischem pH-Wert (III.3.3.1.).

### 5.3.3. Massenspektren der Basen nach enzymatischer Hydrolyse

Zusätzlich zu den vorangegangenen Charakterisierungsmethoden werden die Massenspektren der drei isolierten Basen mit denen der üblichen Basen verglichen. Abb. 6-8 zeigen die Massenspektren der Basen 2a, 2b und 3 im Vergleich mit den Massenspektren der Basen Uracil, Adenin und Guanin.
Die Auswertung der Massenspektren zeigt, daß
die Base von Metabolit 2a und Uracil,
die Base von Metabolit 2b und Adenin,
die Base von Metabolit 3 und Guanin
identisch sind. Damit werden in einem unabhängigen Versuch die Basen identifiziert und die bisher erhaltenen Versuchsergebnisse bestätigt.

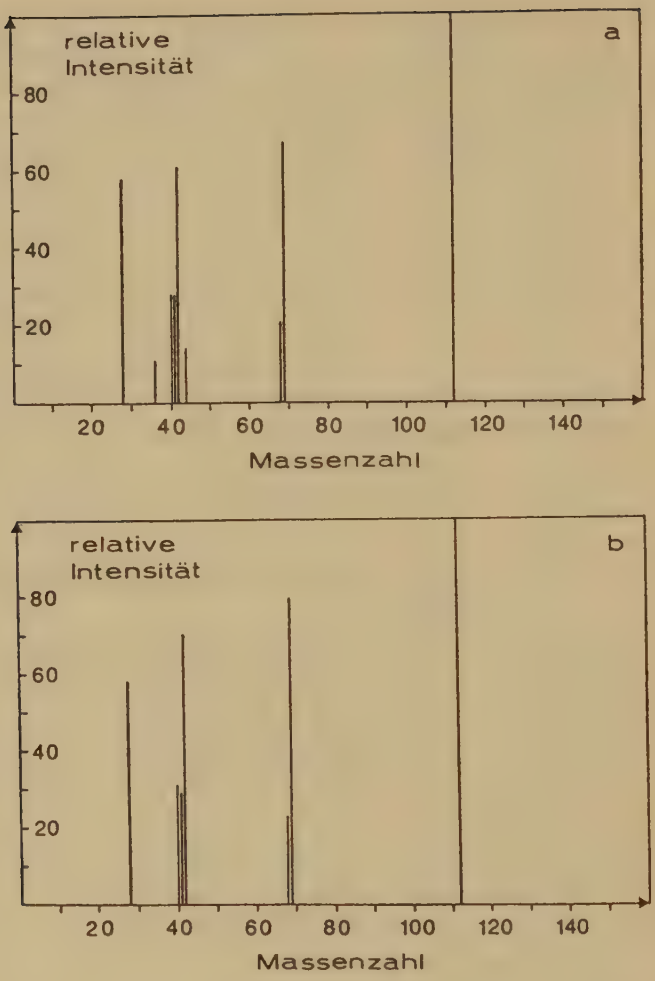



Abb. 6: Massenspektren von
a) Uracil
b) Base 2a

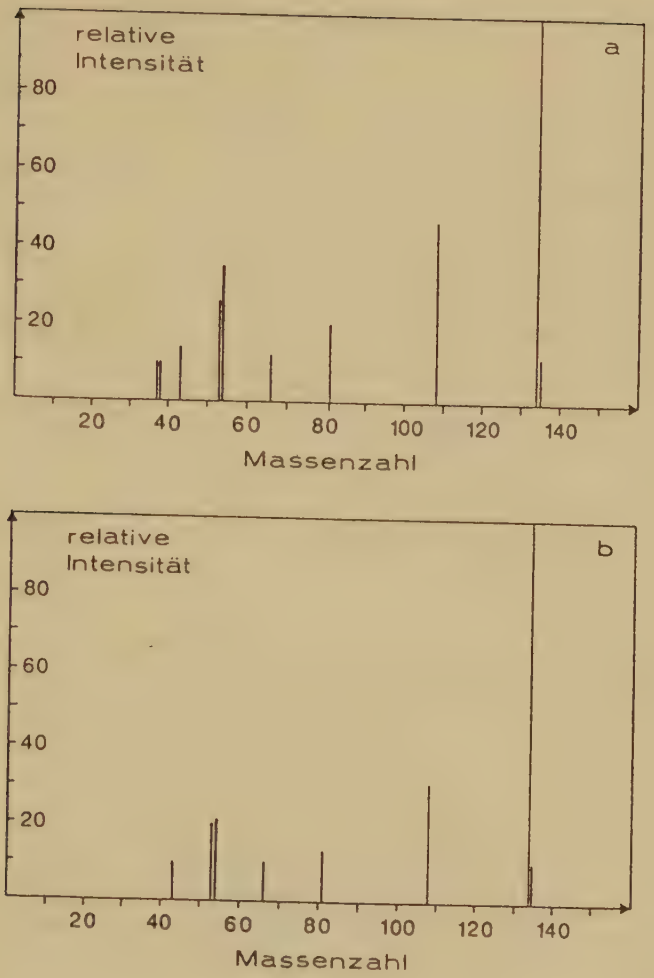



Abb. 7: Massenspektren von
a) Adenin
b) Base 2b

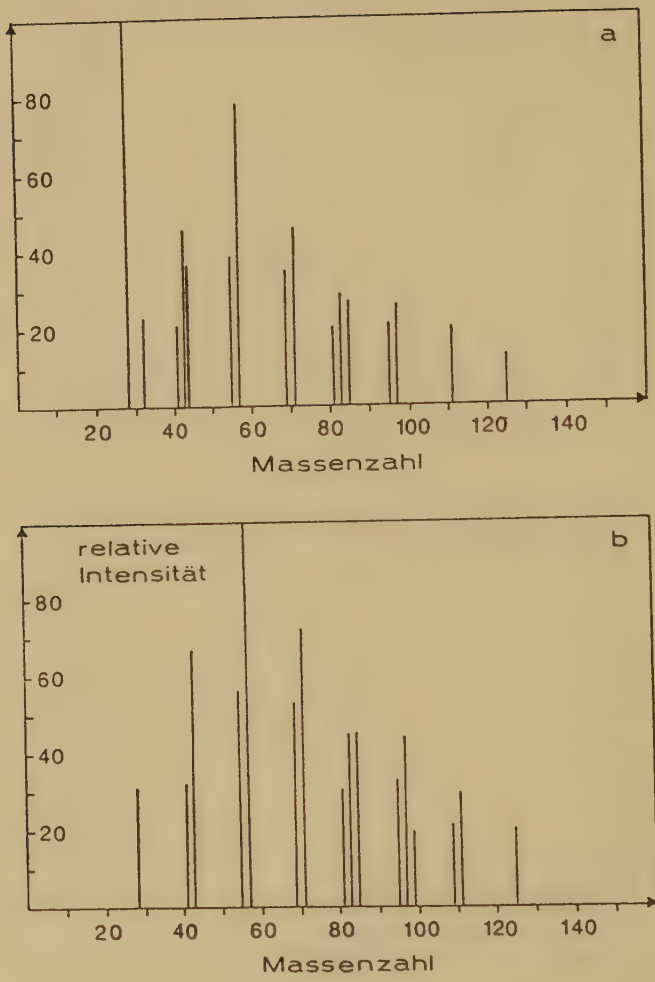



Abb. 8: Massenspektren von
a) Guanin
b) Base 3

### 5.3.4. Enzymatische Charakterisierung der UV-absorbierenden Metabolite

Nach Identifizierung der Zucker- und der Basenkomponente wird die Verknüpfung zwischen Base und Zucker untersucht. Das geschieht mit Hilfe von Enzymen, die eine Spezifität für die Bindung zwischen Base und Zucker aufweisen. In den bisherigen Versuchen wurden die Nucleoside mit den Nucleosidphosphorylasen abgebaut. Substrate für die Purinnucleosidphosphorylasen haben das C-1-Atom des Zuckers in einer ß-glykosidischen Bindung am N-9 des Purinringes gebunden. Die $\alpha$-Konfiguration ist inaktiv oder hemmt die Purinnucleosidphosphorylase. Purinnucleosidphosphorylasen sind wahrscheinlich auch zuckerspezifisch, denn Arabinose-1-phosphat kann Ribose-1-phosphat nicht ersetzen. Die Spaltbarkeit der Nucleoside 2a, 2b und 3 durch die Nucleosidphosphorylasen deutet daraufhin, daß diese Substanzen eine entsprechende Verknüpfung aufweisen.

In den folgenden Versuchen werden zusätzlich einige Nucleoside und Basen mit Enzymen bestimmt, durch die sie in andere Nucleoside oder Basen überführt werden, was an Hand der Veränderung der Spektren verfolgt werden kann. Die Umsetzung von Adenin und der Base 2b durch die Xanthin-Oxidase führt zu einer Zunahme der Extinktion bei 293 nm von $\Delta$ E/min = 0,005 (III.3.5.3.). Die Umsetzung von Guanin und Base 3 durch die Guanase (III.3.5.4.) zeigt Abb. 9, und die Umsetzung von Nucleosid 1 und Cytidin durch die Cytidindesaminase (III.3.5.5.) führt zu einer Zunahme der Extinktion bei 282 nm von $\Delta$ E/min von 0,020.

Die Auswertung aller chromatographischen, spektroskopischen und enzymatischen Analysen der vier isolierten Metabolite zeigt, daß ihre Basenkomponenten die vier üblichen Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Uracil sind.

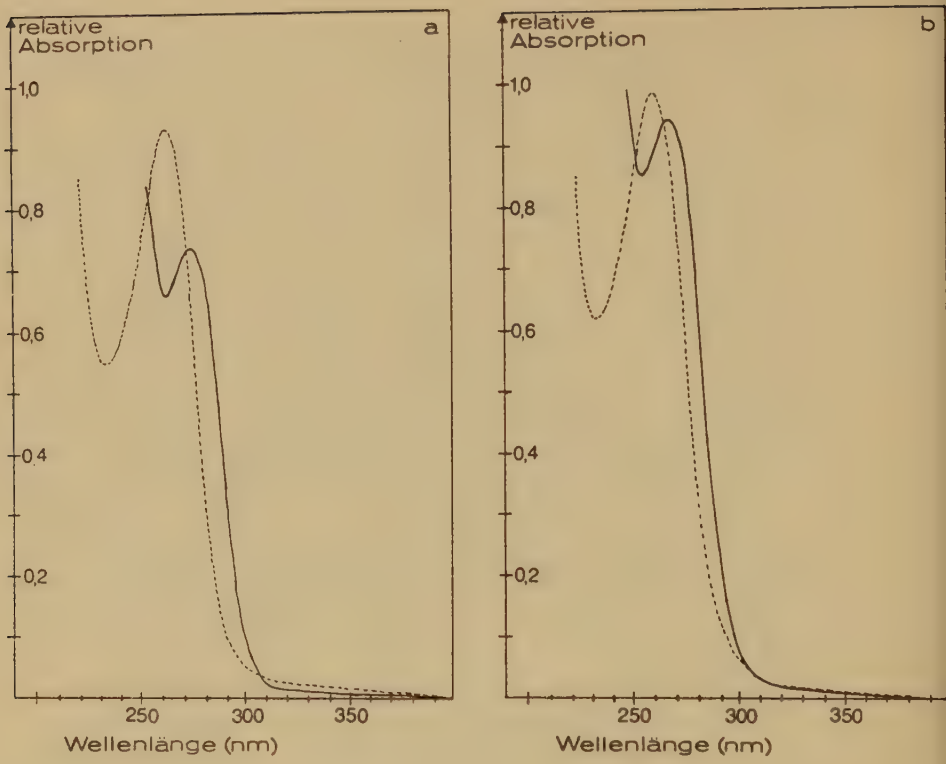



Abb. 9: UV-Spektren von
a) Guanin
b) Base 3
Die durchgezogene Linie zeigt die UV-Spektren der Substanzen vor Behandlung mit der Guanase und die unterbrochene Linie zeigt die UV-Spektren der Substanzen nach Behandlung mit der Guanase (III.3.5.4.)

Zusammen mit den Ergebnissen zur Charakterisierung der Zuckerkomponente und der Phosphatgruppe ergibt sich, daß die vier aus dem Kulturmedium des Basidiomyceten QM 806 isolierten Metabolite die gewöhnlichen 3'-Ribonucleosidmonophosphate sind.

5.3.5. Isotachophorese der UV-absorbierenden Metabolite

Die meisten der angewandten Methoden zur Charakterisierung der vier isolierten Metabolite erfordert eine chemische oder enzymatische Vorbehandlung der Metabolite.
Mit dem analytischen Verfahren der Isotachophorese besteht die Möglichkeit, die nativen Metabolite mit den Referenzsubstanzen zu vergleichen. Der bei dieser Methode auftretende Potentialsprung wird ausgewertet. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse gibt Tab. 7 wieder.
Durch diese Daten wird das Resultat aller vorangegangenen Untersuchungen noch einmal bestätigt. Die isolierten Metabolite sind mit den vier üblichen 3'-Ribonucleosidmonophosphaten identisch.

| Metabolite | PU | Referenz-substanzen | PU |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,710 | 3'-CMP | 0,705 |
| 2a | 0,390 | 3'-UMP | 0,398 |
| 2b | 0,593 | 3'-AMP | 0,584 |
| 3 | 0,420 | 3'-GMP | 0,410 |

Tab. 7: Die Auswertung der Isotachophorese erfolgt über den auftretenden Potentialsprung, der in Potentialeinheiten (PU) angegeben wird.

$$PU = \frac{P_S - P_L}{P_F - P_L}$$

$P_S$ = Potentialgradient der Probe
$P_L$ = Potentialgradient des Leitions
$P_F$ = Potentialgradient des Folgeions

## 5.4. Mikrobiologische Untersuchung der UV-absorbierenden Metabolite

Die bisher gewonnenen Ergebnisse aus den analytischen Untersuchungsverfahren werden durch biologische Untersuchungen in zwei Richtungen bestätigt, einmal daß natürliche Nucleoside und Basen das Wachstum von auxotrophen Mutanten aufrecht erhalten und zum anderen, daß modifizierte Nucleoside (Nucleosidantibiotika) das Wachstum hemmen.

### 5.4.1. Untersuchung der UV-absorbierenden Metabolite auf Wuchsstoffcharakter mit purin- und pyrimidinauxotrophen Mutanten

Die üblichen 3'-Ribonucleosidmonophosphate weisen bei purin- oder pyrimidinauxotrophen Mutanten Wuchsstoffcharakter auf, während in Gegenwart stark modifizierter oder antibiotisch wirksamer Nucleinsäurederivate kein Wachstum der Mutanten möglich ist.
Die Anzucht der Mutanten erfolgt in 50 ml M9-Gly-Medium (III.1.2.) in 250 ml Klettkolben. Konzentrierte Lösungen der Nucleoside Adenosin und Uridin, sowie der Nucleoside 2a und 2b werden steril filtriert und in verschiedenen Konzentrationen dem Medium zugesetzt (Abb. 10 und 11). Das Wachstum der Mutanten wird verfolgt durch stündliches Messen der Kulturdichte im Klettcolorimeter. Nucleosid 2a zeigt bei der pyrimidinauxotrophen Mutante den gleichen Wuchsstoffcharakter wie Uridin. Das Wachstum der purinauxotrophen Mutante wird von Nucleosid 2b und Adenosin in gleicher Weise gefördert. Auch durch Zusatz von Nucleosid 1 zum M9-Gly-Medium kann das Wachstum der pyrimidinauxotrophen Mutante und das der purinauxotrophen Mutante durch Nucleosid 3 erzielt werden. Diese Experimente weisen daraufhin, daß die isolierten Ribonucleotide normale Nucleinsäurebausteine sind.

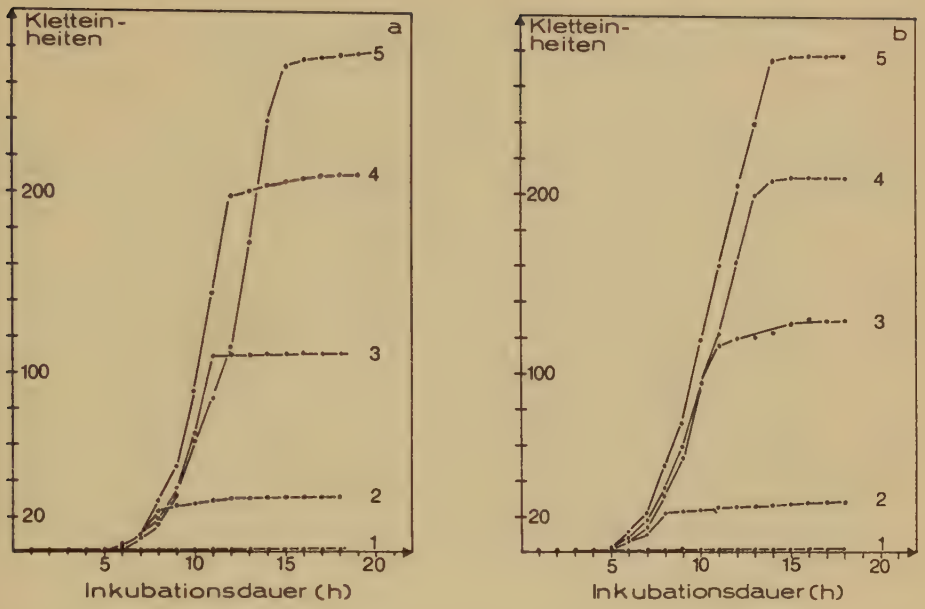
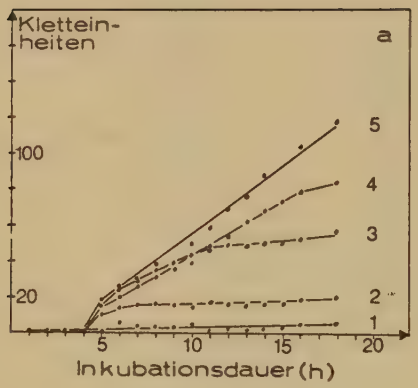



Abb. 10: Wachstum von E. coli ATCC 12632 (pyrimidin-auxotroph) in Abhängigkeit von
a) der Uridinkonzentration
b) der Konzentration an Nucleosid 2a

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Pyrimidinkonzentration (µg/ml) | 0 | 2 | 10 | 20 | 30 |



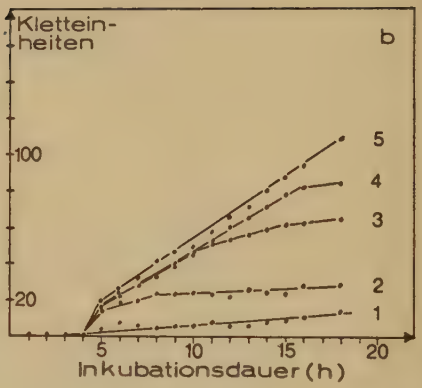




Abb. 11: Wachstum von E. coli ATCC 13473 (purinauxotroph) in Abhängigkeit von
a) der Adenosinkonzentration
b) der Konzentration an Nucleosid 2b

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| Purinkonzentration (µg/ml) | 0 | 2 | 10 | 20 | 30 |

### 5.4.2. Untersuchung der UV-absorbierenden Metabolite auf ihre antibiotische Wirksamkeit

Die antibiotische Wirksamkeit der Metabolite 1, 2a, 2b und 3 wird mit Hilfe des Plattendiffusionstestes geprüft (III.1.2.). Staph. aureus W 1194 (als Vertreter der grampositiven Bakterien) und E. coli ATCC 11303 (als Vertreter der gramnegativen Bakterien) dienen als Versuchsobjekte. Getestet werden das unbehandelte Kulturfiltrat (100 $O.D._{260}$-Einheiten/ml) des Basidiomyceten QM 806 und die vier isolierten Metabolite (20 $O.D._{260}$-Einheiten/ml). Als Kontrollsubstanz dient Penicillin. Während beide Bakterienstämme gegenüber Penicillin einen Hemmhof zeigen, beeinflussen das Kulturfiltrat und die isolierten Metabolite das Wachstum der Bakterien nicht. Es ergeben sich somit keine Hinweis für Substituenten an den Basen, die zu einer antibiotischen Wirksamkeit führen.

## 6. Untersuchungen zur Herkunft der vom Basidiomyceten QM 806 ausgeschiedenen 3'-Ribonucleosidmonophosphate

### 6.1. Relation von Trockengewicht , extrazellulärem Protein und den extrazellulären 3'-Ribonucleosidmonophosphaten

In den vorangegangenen Versuchen werden die extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite des Basidiomyceten QM 806 als 3'-Ribonucleosidmonophosphate identifiziert. Danach ist es jetzt möglich, die molaren Konzentrationen an Nucleosid-3'-monophosphaten zu errechnen und in Relation zum Trockengewicht zu setzen. Außerdem erfolgt eine Bestimmung des extrazellulären Proteins (III.3.2.6.) (Abb. 12).

Unter Zugrundelegung der molaren Extinktionskoeffizienten für die vier verschiedenen Ribonucleotide, die in den einzelnen Fraktionen enthalten sind (Abb. 5), ergibt

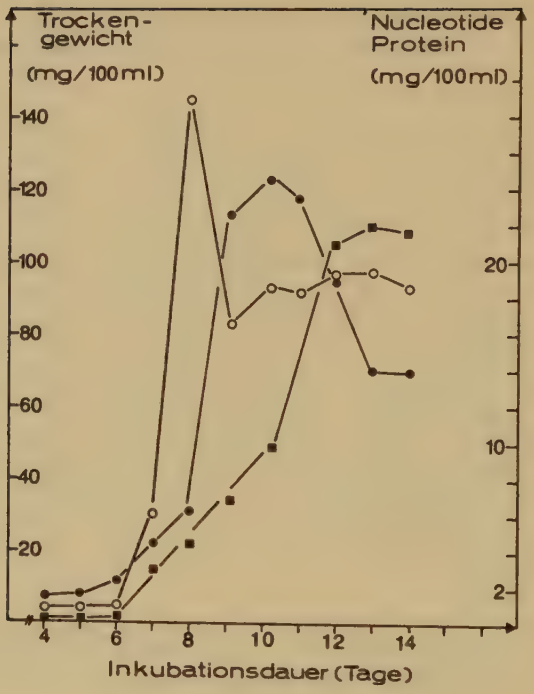



Abb. 12: Verlauf des Trockengewichtes ( o—o—o ),
der extrazellulären Nucleotide ( ●—●—● )
und des extrazellulären Proteins ( ■—■—■ )
während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806.

sich, daß die Nucleotide etwa in äquimolaren Konzentrationen vorkommen.
Das Trockengewicht erreicht am 8. Tag den höchsten Wert und sinkt bis zum 9. Tag um 1/3 ab. In dieser Zeitspanne (vom 8. zum 9. Tag) erfolgt die starke Ausscheidung der Nucleotide. Die höchste Konzentration der 3'-Ribonucleotide wird nach einer Inkubationsdauer von 10 Tagen erreicht. Gewichtsmäßig entspricht die Menge der 3'-Ribonucleotide im Medium 17 % des höchsten Trockengewichtes der Zellen. Nach unseren heutigen Vorstellungen über die Bildung von Nucleotiden können 3'-Ribonucleotide nur durch enzymatischen Abbau von Ribonucleinsäuren entstehen. Das Auftreten der großen Mengen an 3'-Ribonucleotiden im vorliegenden Experiment kann deshalb als Ausdruck eines sehr höhen RNA-Abbaus gewertet werden.
Die Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide allein erklärt aber noch nicht die gesamte Abnahme des Trockengewichtes um 33 %. Der Organismus scheidet zusätzlich noch erhebliche Mengen an Protein in das Kulturmedium aus. Die Gesamtmenge an Protein umfaßt weitere 15 % des höchsten Trockengewichtes. Bei diesen Proteinen handelt es sich um die extrazellulären Enzyme, die der Basidiomycet QM 806 in das Kulturmedium ausscheidet.

### 6.2. Vergleich der extrazellulären Nucleotidkonzentration mit dem intrazellulären Gehalt an säurelöslichen Nucleotiden und an Nucleinsäuren

In diesem Versuch wird die Konzentration der extrazellulären 3'-Ribonucleotide mit dem intrazellulären DNA- und RNA-Gehalt und der Konzentration der intrazellulären säurelöslichen Nucleotide verglichen.
Die Anzucht des Pilzes erfolgt im Fermenter. Zu den in Abb. 13 angegebenen Zeiten werden Proben von jeweils 100 ml entnommen und wie unter III.2. angegeben aufgearbeitet. Vom Kulturüberstand wird die Absorption bei 260 nm gemessen und in umol Nucleotid/100 ml Kultur umgerechnet. Vom Mycel wird das Trockengewicht, der

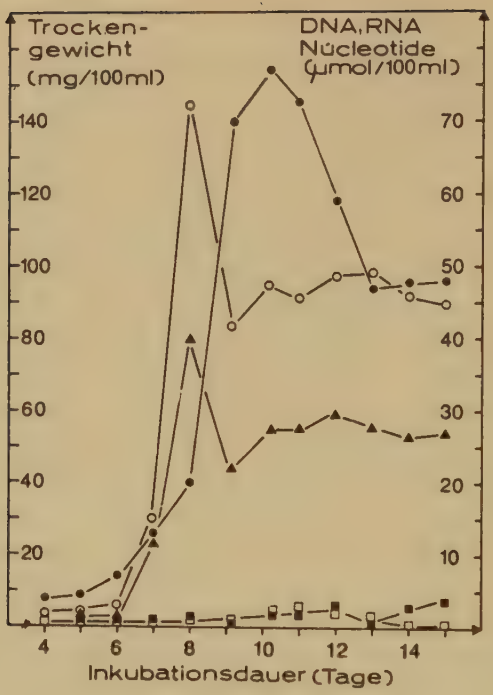



Abb. 13: Verlauf des Trockengewichtes ( ○—○—○ ) der extrazellulären Nucleotide ( ●—●—● ), der intrazellulären säurelöslichen Nucleotide ( ■—■—■ ) und des intrazellulären DNA- ( □—□—□ ) und RNA-Gehaltes ( ▲—▲—▲ ) während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806.
Der umolare DNA- und RNA-Gehalt bezieht sich auf den umolaren Gehalt an Desoxyribose bzw. Ribose (III.3.2.3. und III.3.2.4.).

DNA- und RNA-Gehalt und die Konzentration der intrazellulären säurelöslichen Nucleotide bestimmt. RNA-Gehalt und Trockengewicht laufen weitgehend parallel zueinander. Nach Erreichen eines maximalen Wertes am 8. Tag sinken RNA-Gehalt und Trockengewicht um 1/3. Während dieses Abfalls erfolgt die intensive Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide in das Kulturmedium. Die Konzentration der intrazellulären säurelöslichen Nucleotide ist sehr gering und bleibt während des ganzen Experimentes annähernd konstant. Das gleiche gilt für den DNA-Gehalt.

### 6.3. Markierungsversuche mit radioaktiven Purin- und Pyrimidinbasen

Durch Zugabe von radioaktiven Basen zum Kulturmedium kann deren Aufnahme durch den Basidiomyceten QM 806, der intrazelluläre Einbau in die Nucleinsäuren und in die säurelöslichen Nucleotide und die anschließende Ausscheidung der radioaktiven Metabolite in das Kulturmedium verfolgt werden.

#### 6.3.1. Aufnahme und Ausscheidung von radioaktiven Purinen und Pyrimidinen durch den Basidiomyceten QM 806

Bei Kulturbeginn werden dem Kulturmedium $^{14}$C-Adenin bzw. $^{14}$C-Uracil zusammen mit kaltem Adenin bzw. Uracil zugesetzt. Während des Wachstums wird im Kulturmedium die Radioaktivität und die UV-Absorption bestimmt (III.5.). Abb. 14 und 15 zeigen, daß die angebotenen radioaktiv markierten Basen weitgehend aufgenommen werden. Mit Beginn der Ausscheidung der 3'-Nucleotide nimmt die Radioaktivität im Kulturmedium wieder zu. Es wird geprüft, ob es sich dabei um 3'-Ribonuceosidmonophosphate handelt, in die die aufgenommenen Basen umgewandelt werden. Dazu wird zum Zeitpunkt der maximalen Konzentration der 3'-Nucleotide im Kulturmedium (am 9. Tag der Kultivierung) der auf 1/10 des Volumens eingeengte Kulturüberstand auf der "kleinen" Sephadex G-10 Säule aufge-

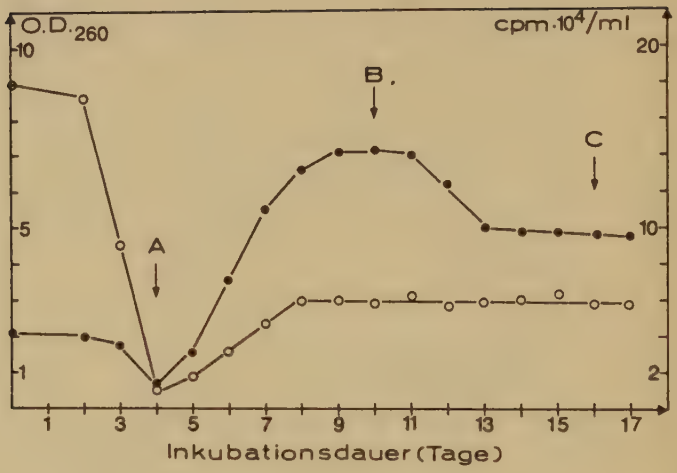



Abb. 14: Verlauf der Extinktion bei 260 nm (●——●——●) und der Radioaktivität in cpm ( o—o—o ) im Kulturfiltrat während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806 nach Zugabe von $^{14}$C-Adenin zum Kulturmedium zu Beginn der Kultivierung.

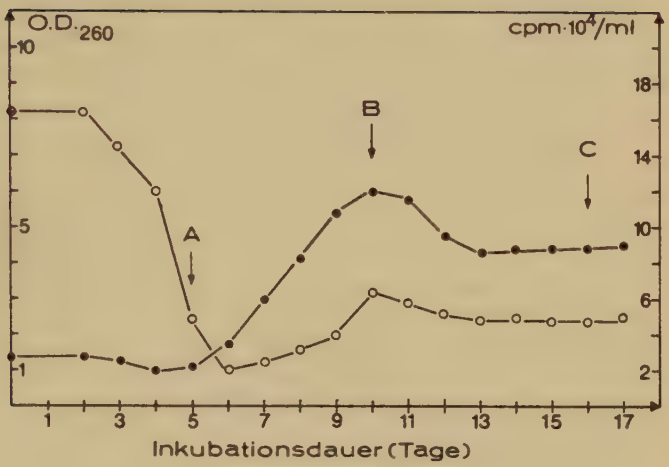



Abb. 15: Verlauf der Extinktion bei 260 nm ( ●——●——● ) und der Radioaktivität in cpm ( o—o—o ) im Kulturfiltrat während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806 nach Zugabe von $^{14}$C-Uracil zum Kulturmedium zu Beginn der Kultivierung.

trennt (III.3.1.1.). Von den einzelnen Fraktionen wird die Extinktion bei 260 nm und die Radioaktivität bestimmt (Abb. 16 und 17). Nach Zugabe von $^{14}$C-Uracil zum Kulturmedium sind die beiden Pyrimidinnucleotide, Metabolit 1 und 2a radioaktiv markiert (Abb. 17b). Aus Abb. 16b wird ersichtlich, daß nach Zugabe von $^{14}$C-Adenin zum Kulturmedium die Radioaktivität unter dem Puringipfel ( 2b und 3) liegt. Da die Gipfel 2b und 3 nicht voneinander getrennt sind, werden die Fraktionen des gesamten radioaktiven Gipfels vereinigt, lyophilisert und davon eine Dünnschichtchromatographie in Fließmittel 3 (III.3.1.3.) durchgeführt (Tab. 8). Die Lokalisation der Radioaktivität auf dem Dünnschichtchromatogramm geschieht mit Hilfe eines Dünnschichtscanners (Abb. 18). Das Scannerbild zeigt, daß die Zone von Metabolit 2b und Metabolit 3 radioaktiv markiert ist.
Durch $^{14}$C-Uracil werden beide Pyrimidinnucleotide und durch $^{14}$C-Adenin beide Purinverbindungen markiert. Der Basidiomycet QM 806 nimmt also die radioaktiven Basen auf, baut sie intrazellulär um und scheidet sie in Form von 3'-Nucleotiden wieder aus.

| aufgetragene Substanz | $R_F$-Werte |
|---|---|
| Adenin | 0,13 |
| Adenosin | 0,16 |
| 3'AMP | 0,21 |
| radioaktive Probe | 0,21; 0,42 |
| 3'GMP | 0,42 |
| Guanosin | 0,35 |
| Guanin | 0,33 |

Tab. 8: $R_F$-Werte nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung in Fließmittel 3 (III.3.1.3.).

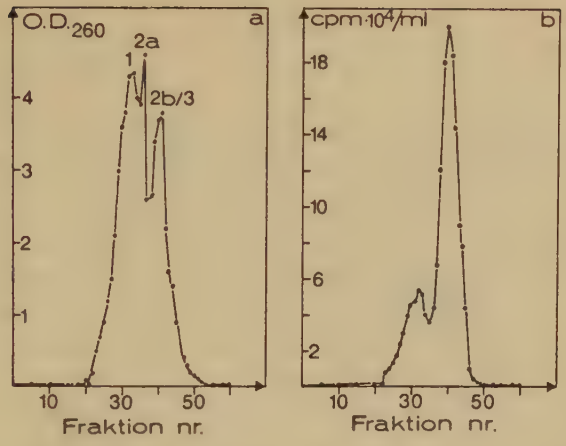



Abb. 16: a) Säulenchromatographische Auftrennung des Kulturfiltrats aus Wachstumsphase B an Sephadex G-10 ("kleine" Säule, Fraktionsvolumen:3 ml) Dem Kulturmedium wurde zu Kulturbeginn $^{14}$C-Adenin zugesetzt.

b) Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen nach Auftrennung an Sephadex G-10.

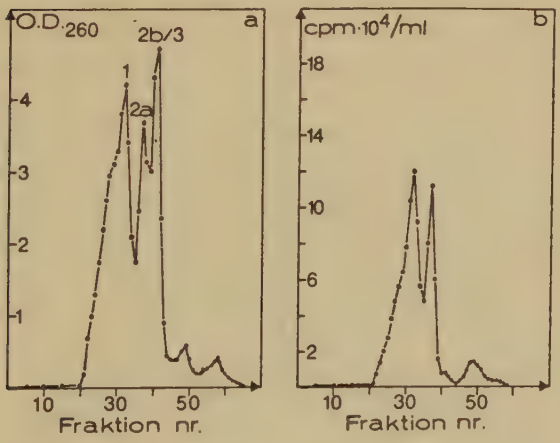



Abb. 17: a) Säulenchromatographische Auftrennung des Kulturfiltrats aus Wachstumsphase B an Sephadex G-10 ("kleine" Säule, Fraktionsvolumen:3 ml) Dem Kulturmedium wurde zu Kulturbeginn $^{14}$C-Uracil zugesetzt.

b) Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen nach Auftrennung an Sephadex G-10.

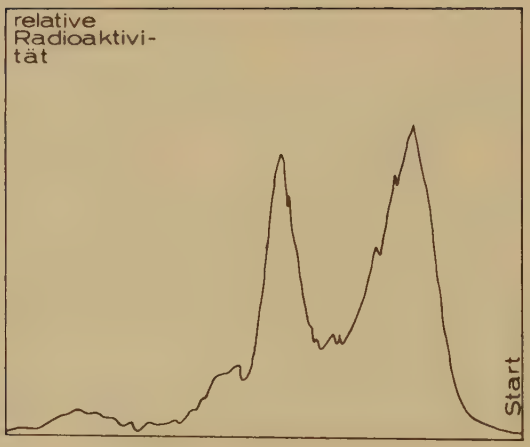



Abb. 18: Lokalisation der Radioaktivität auf dem Dünnschichtchromatogramm nach Auftrennung der radioaktiven Probe in Fließmittel 3 (III.3.1.3.) mit Hilfe eines Dünnschichtscanners. Die radioaktiven Gipfel entsprechen den Zonen der Metabolite 2b und 3 (siehe Tab. 8).

### 6.3.2. Bestimmung der prozentualen Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806

In diesem Versuch wird die prozentuale Verteilung der Radioaktivität in folgenden Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 bestimmt:

A: nach Aufnahme der Radioaktivität

B: zum Zeitpunkt maximaler Konzentration der UV-absorbierenden Metabolite im Kulturmedium

C: nach Reduktion der ausgeschiedenen Metabolite um 1/3

Diese Zeiten sind in Abb. 14 und 15 durch Pfeile markiert. Die Kulturen werden zu den entsprechenden Zeiten abgeerntet und wie unter III.2. angegeben aufgearbeitet. Tab. 9 zeigt die prozentuale Verteilung der Radioaktivität in den drei angegebenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806 in den drei Fraktionen:
extrazelluläre Nucleotide (1)
säurelösliche intrazelluläre Nucleotide (2)
säureunlösliche Makromoleküle (3)
Zum Zeitpunkt A ist extrazellulär noch ein Rest der Radioaktivität von 7 % bzw. 19 % vorhanden. Die aufgenommene Radioaktivität ist annähernd zu gleichen Teilen auf die säurelösliche und auf die säureunlösliche Fraktion verteilt. Der Prozentsatz in der säureunlöslichen Fraktion zeigt deutlich, daß die aufgenommenen Basen in die Nucleinsäuren eingebaut werden. Zum Zeitpunkt maximaler Konzentration der 3'-Ribonucleotide im Kulturmedium (B) steigt die extrazelluläre Radioaktivität deutlich an während intrazellulär die Radioaktivität abnimmt. Das läßt darauf schließen, daß die extrazellulären 3'-Nucleotide aus den Nucleinsäuren und der intrazellulären säurelöslichen Nucleotidfraktion entstammen. Beim Übergang von Wachstumsphase B in Phase C bleibt der extrazelluläre Prozentsatz der Radioaktivität annähernd un-

| | Markierung mit | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $^{14}$C-Adenin | | | $^{14}$C-Uracil | | |
| | Wachstumsphase | | | Wachstumsphase | | |
| | A | B | C | A | B | C |
| extrazelluläre Nucleotide | 7 | 30 | 31 | 19 | 40 | 31 |
| säurelösliche intrazelluläre Nucleotide | 49 | 24 | 3 | 35 | 24 | 3 |
| säureunlösliche Makromoleküle | 45 | 21 | 2 | 33 | 14 | 2 |
| Gesamtradioaktivität | 101 | 75 | 36 | 87 | 78 | 36 |

Tab. 9: Prozentuale Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Wachstumsphasen des Basidiomyceten QM 806. Die zu Kulturbeginn zugesetzte Radioaktivität wird gleich 100 % gesetzt.

verändert, während intrazellulär zum Zeitpunkt C nur noch 5 % der Radioaktivität vorhanden sind. Die starke intrazelluläre Abnahme der Radioaktivität spricht für einen sehr raschen turn over der Nucleinsäuren und Ausscheidung der abgebauten Metabolite. Wie gezeigt werden konnte, erfolgt die Ausscheidung der radioaktiven Metabolite in Form von 3'-Ribonucleosidmonophosphaten. Tab. 9 zeigt, daß in Wachstumsphase C nur noch 36 % der zugesetzten Gesamtradioaktivität nachweisbar sind. Die fehlende Radioaktivität findet sich zu einem erheblichen Teil als $CO_2$ in der Gasphase. Die quantitative

Bestimmung der Freisetzung an $^{14}CO_2$ in der Warburg-Apparatur ergibt, daß ein erheblicher Anteil der Radioaktivität, die in den späteren Phasen der Inkubation ( in den Phasen B und C) fehlt, als $CO_2$ vorliegt. Dies zeigt, daß sowohl die Purin- als auch die Pyrimidin-3'-Ribonucleotide in den späteren Phasen des Experimentes wieder aufgenommen und abgebaut werden.

### 6.4. Ausscheidung der UV-absorbierenden Metabolite in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration

Es ist bekannt, daß E. coli bei einem Mangel an Substraten oder bei Phosphatmangel Ribosomen und auch ribosomale RNA abbaut. Die Abbauprodukte werden in Form von Nucleosiden und Basen ins Kulturmedium ausgeschieden (Maruyama et al., 1970). In diesem Versuch wird geprüft, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Phosphatkonzentration im Kulturmedium und der Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide.
Die Kultivierung des Basidiomyceten QM 806 erfolgt in 200 ml Medium im 1l Erlenmeyerkolben (III.1.1.). Das normale Medium enthält 0,2 % Phosphat (Abb. 19b). Die Senkung der Phosphatkonzentration auf die Hälfte (Abb. 19a) oder die Verdoppelung der Phosphatkonzentration (Abb. 19c) zeigen keinen Einfluß auf die Nucleotidausscheidung. Eine Erniedrigung der Phosphatkonzentration auf 0,05 % verhindert das Wachstum des Organismus. Das zeigt also, daß in dem untersuchten (engen) Bereich keine Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration besteht.

### 6.5. Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide in Abhängigkeit vom pH-Wert

Während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806 sinkt der pH-Wert im Kulturmedium von 6,2 auf 2,3 und erreicht als Endwert wiederum 6,2. Während der pH-Wert im Kulturmedium sinkt, beginnt die intensive Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide.

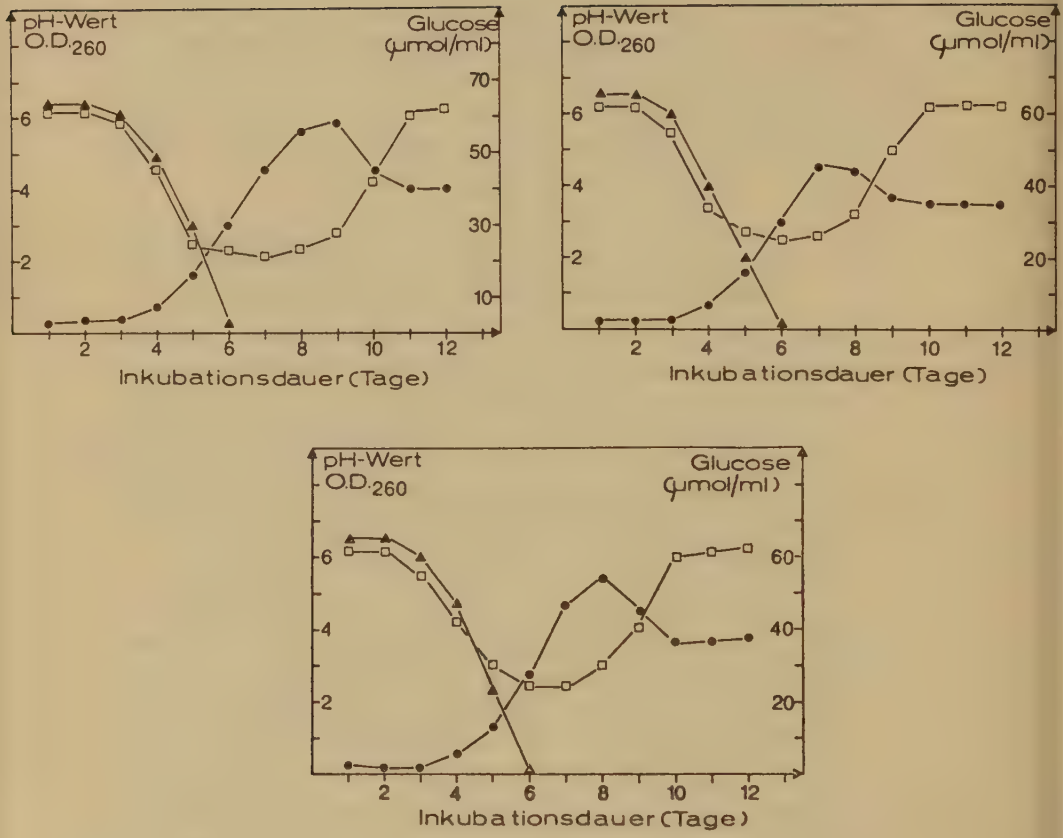



Abb. 19: Verlauf des pH-Wertes (□—□—□), der Glucosekonzentration (▲—▲—▲) und der Extinktion bei 260 nm (●——●——●) im Kulturfiltrat während des Wachstums des Basidiomyceten QM 806 in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration

a) das Medium enthält 0,1 % Phosphat
b) das Medium enthält 0,2 % Phosphat
c) das Medium enthält 0,4 % Phosphat

Es wird nun geprüft, ob ein Zusammenhang besteht zwischen den pH-Wert-Veränderungen und der Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide. Durch Erhöhung der Pufferkapazität(Citrat-Phosphat-Puffer) gelingt es, die pH-Wert-Schwankungen während des Wachstums weitgehend auszuschalten. Dabei zeigt sich, daß über den Bereich von pH 3 bis pH 6 die Nucleotidausscheidung weitgehend vom pH-Wert unabhängig ist (Tab. 10).

| Ausgangs-pH-Wert | maximale $O.D._{260}$ |
|---|---|
| 3 | 3,4 |
| 4 | 3,0 |
| 5 | 3,3 |
| 6 | 3,6 |

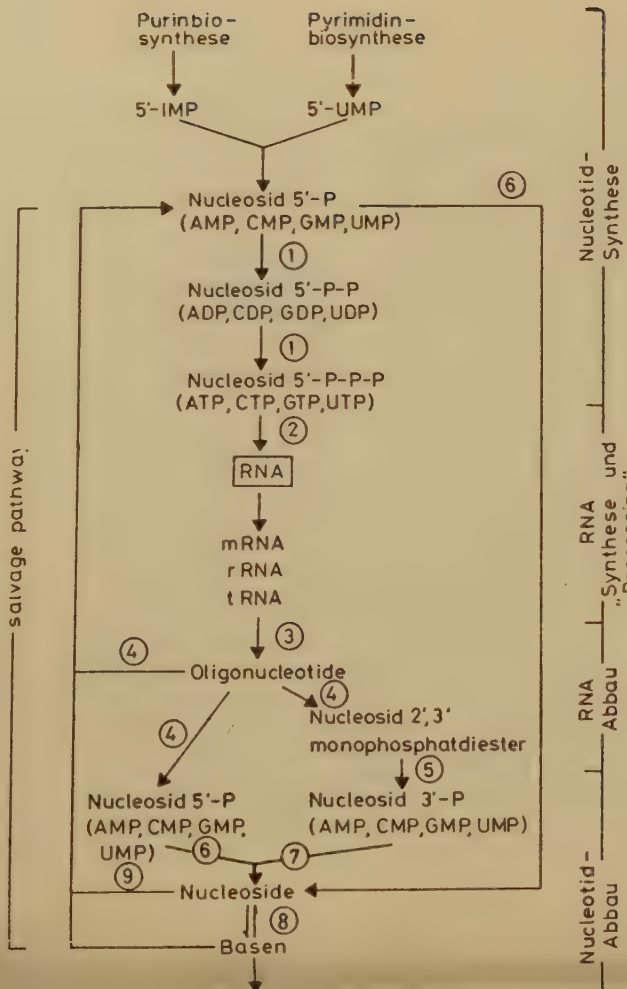
Tab. 10: Ausscheidung der Nucleotide in Abhängigkeit vom Ausgangs-pH-Wert des Kulturmediums. Das Medium wird mit Citrat-Phosphat-Puffer auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und die Extinktion bei 260 nm während des Wachstums verfolgt. Die Tabelle zeigt die höchsten Extinktionswerte, die während des Wachstums bei den entsprechenden pH-Werten erreicht werden.

## V. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird die Ausscheidung von Nucleotiden durch den Basidiomyceten QM 806 untersucht. Nach Verbrauch der Kohlenstoffquelle und dem Erreichen des maximalen Trockengewichtes beginnt die starke Ausscheidung von Metaboliten in das Kulturmedium (Abb. 1). Die UV-Spektren des Kulturfiltrats, das diese Metaboliten enthält (Abb. 2), sind typisch für Nucleinsäuren oder deren Bausteine. Diese erreichen im Kulturmedium eine Konzentration bis zu 1 umol/ml (Abb. 13). Diese Konzentration ist etwa doppelt so hoch wie der gesamte intrazelluläre Gehalt an Nucleotiden, DNA und RNA der Zellen aus dem gleichen Kulturvolumen (Abb. 13 und Tab.12). Die Ausscheidung der Nucleinsäurebausteine ist mit einer Abnahme des Trockengewichtes verbunden. Aus Abb. 12 und Tab. 13 geht hervor, daß das Trockengewicht vom 8. auf den 10. Inkubationstag ungefähr um 1/3 absinkt. Setzt man die Abnahme des Trockengewichtes in dieser Zeitspanne gleich 100 %, so bewirkt die Ausscheidung der Nucleinsäurebausteine eine Abnahme um 35 %. Während anschließend die extrazelluläre Konzentration der Nucleotide vom 10. zum 14. Inkubationstag um ungefähr 1/3 sinkt, nimmt der extrazelluläre Gehalt an Proteinen deutlich zu. Diese Proteine sind zum großen Teil extrazelluläre Enzyme, vor allem Glucanasen und Proteasen. Diese Sekretion von extrazellulären Enzymen ist an eine aktive Proteinsynthese gebunden und kann durch Hemmstoffe der Proteinsynthese blockierte werden (Friebe, 1973). Diese Beobachtung sowie das Fehlen mikroskopisch sichtbarer Veränderungen am Mycel schließt aus, daß das Auftreten der Nucleotide im Kulturmedium die Folge einer Lyse der Zellen ist.

Bei extrazellulären Nucleinsäurederivaten kann es sich um normale Nucleinsäurebausteine, um seltene Basen ("minor bases") oder um Nucleosidantibiotika handeln. Normale oder seltene Basen können aufgrund genetischer Defekte

an Enzymen des Nucleinsäureauf- oder -abbaus oder bei sehr hohem RNA-Umsatz zur Ausscheidung kommen (siehe Einleitung).
Zur Klärung der Frage, ob der Basidiomycet QM 806 normale oder modifizierte Nucleinsäureverbindungen in das Kulturmedium ausscheidet, werden die extrazellulären UV-absorbierenden Metabolite zunächst isoliert und charakterisiert. Die Isolierung der extrazellulären Metabolite erfolgt chromatographisch an Sephadex G-10 und an DEAE-Cellulose. Es wird eine Auftrennung in vier Substanzen erreicht, die in annähernd äquimolarer Konzentration vorliegen. Der Charakterisierung dieser Metabolite dienen sowohl chemisch-analytische als auch biologische Methoden. Die quantitative Phosphatbestimmung und die Abspaltbarkeit der Phosphatgruppen mit der 3'-Nucleotidase liefern den Beweis, daß die isolierten Metabolite 3'-Nucleosidmonophosphate sind. Die dünnschicht- und papierchromatographische Untersuchung der aus den Nucleotiden isolierten Zuckerkomponente sowie die Charakterisierung der Basen mit chromatographischen, spektroskopischen und enzymatischen Methoden zeigen, daß die vier Metabolite die üblichen 3'-Ribonucleosidmonophosphate (3'-AMP, 3'-CMP, 3'-GMP, 3'-UMP) sind. Dieses Ergebnis wird durch biologische Versuche bestätigt. Die isolierten Nucleotide unterstützen das Wachstum von auxotrophen E. coli-Mutanten (Abb. 10 und 11) und weisen keine antibiotische Wirksamkeit auf (IV.5.4.2.). Damit sind die ausgeschiedenen UV-absorbierenden Metabolite als 3'-Ribonucleosidmonophosphate charakterisiert.
Da nun sicher ist, daß der Pilz normale Nucleinsäurebausteine in das Kulturmedium ausscheidet, stellt sich die Frage nach der Herkunft dieser Nucleotide und dem Grund der Ausscheidung. Abb. 20 zeigt, daß die Synthese der Nucleinsäuren über 5'-Nucleotide läuft und




| | |
|---|---|
| 1 | Nucleotidkinasen |
| 2 | RNA-Polymerase |
| 3 | Ribonucleasen (meist Endonucleasen) |
| 4 | Ribonucleasen (meist Exonucleasen) |
| 5 | Phosphodiesterasen |
| 6 | 5'-Nucleotidasen und saure und alkalische Phosphatasen |
| 7 | 3'-Nucleotidasen und saure und alkalische Phosphatasen |
| 8 | Nucleosidphosphorylasen |
| 9 | Nucleosidkinasen |

Abb. 20: Überblick über Synthese und Abbau der RNA

daß nur beim Abbau der Nucleinsäuren 3'-Nucleotide entstehen können. Der Abbau der Ribonucleinsäuren geschieht durch Ribonucleasen (Elson, 1959; Spahr und Hollingworth, 1961; Kaplan und Apirion, 1975), die sich in Endo- und Exonucleasen unterteilen lassen. Bei den Exonucleasen wiederum werden 5'- und 3'-Exonucleasen unterschieden, so daß beim Abbau von Nucleinsäuren sowohl 5'- als auch 3'-Nucleosidmonophosphate entstehen können. 3'- und 5'-Nucleotide werden hydrolytisch zu den entsprechenden Nucleosiden dephosphoryliert. Dies erfolgt bei den 3'-Ribonucleotiden durch die weit verbreiteten und unspezifischen sauren und alkalischen Phosphatasen (Torriani, 1960) und durch die spezifische 3'-Nucleotidase. In entsprechender Weise werden 5'-Ribonucleotide durch unspezifische Phosphatasen und durch spezifische 5'-Nucleotidasen (Ozaki und Shiio, 1979) gespalten. Zu einer Ausscheidung von Nucleotiden kommt es bei einem Ausfall von katabolischen Enzymen, den Phosphatasen bzw. Nucleotidasen (aufgrund genetischer Defekte) oder bei einem so hohen intrazellulären Angebot von Nucleotiden aus dem RNA-Abbau, daß die Kapazität der dephosphorylierenden Enzyme überschritten wird.

| RNA-Art | % der gesamten RNA |
|---|---|
| mRNA | 2 |
| tRNA | 16 |
| rRNA | 82 |

Tab. 11: Die verschiedenen Ribonucleinsäuren von E. coli (Stewart und Letham, 1973).

Es fragt sich nun, aus welcher RNA-Art die ausgeschiedenen Nucleotide vorwiegend stammen. In der Zelle finden sich drei Arten von RNA (Tab. 11). Diese quantitative Verteilung der drei RNA-Arten ist in allen untersuchten

Zellen größenordnungsmäßig gleich (Stewart und Letham, 1973). Unter Berücksichtigung der großen Mengen an ausgeschiedenen 3'-Ribonucleotiden ergeben sich zwei Möglichkeiten für ihre Herkunft. Entweder die Nucleotide entstammen der besonders reichlich vorhandenen rRNA oder einer in viel geringerer Menge vorhandenen RNA-Art, die einem besonders hohen Umsatz unterliegt. Ein hoher Umsatz an tRNA, die erhebliche Mengen an seltenen schwer abbaubaren Basen enthält (Mc Closkey und Nishimura, 1977), ist wenig wahrscheinlich, da Versuche zum Nachweis der seltenen Basen im Kulturfiltrat negativ verliefen. Eine Differenzierung zwischen der mRNA und der rRNA als Quelle für die exogenen 3'-Ribonucleotide sollte über den Nachweis spezifischer terminaler Endgruppen bzw. Reste aus diesen möglich sein. Auch hierzu sind Versuche bisher ohne Ergebnis geblieben. Aus Analogie ähnlicher Nucleotidausscheidungen bei anderen Organismen kann jedoch mit einiger Sicherheit angenommen werden, daß die 3'-Ribonucleotide bevorzugt der rRNA entstammen (Maruyama et al., 1970).
Im allgemeinen sind Ribosomen unter physiologischen Bedingungen sehr stabil (Davern und Meselson, 1960; Simmonovitz und Graham, 1965); sie werden jedoch bei bestimmten Mangel-Situationen abgebaut, z. B. bei Phosphatmangel (Horiuchi et al., 1959; Maruyama und Mizuno, 1970; Belemski und Mallett, 1967), bei $Mg^{2+}$-Mangel (Mc Cathy, 1962; Kennel und Magasanik, 1962; Kennel und Koutolas, 1967; Natori et al., 1966) und bei Stickstoffmangel (Schlessinger und Ben-Hamida, 1966). Eine Abhängigkeit der Nucleotidausscheidung beim Basidiomyceten QM 806 vom pH-Wert (Tab. 10), von der extrazellulären Stickstoffkonzentration (Friebe, unveröffentlicht) und von der extrazellulären Phosphatkonzentration (Abb. 19) läßt sich nicht nachweisen. Dagegen besteht eine Abhängigkeit von der C-Quelle: die Nucleotidausscheidung

setzt ein, wenn die C-Quelle erschöpft ist (Abb. 1 und 13). Dies wurde in einigen Fällen auch bei anderen Mikroorganismen beobachtet (Strange et al., 1961; Borek et al., 1955; Kaplan und Apirion, 1975). Der Kohlenstoffmangel und damit der Entzug der Energiequelle induziert den Abbau der RNA (Kaplan und Apirion, 1975). Im vorliegenden Fall läßt sich parallel zum Einsetzen der Nucleotidausscheidung eine Abnahme der RNA-Konzentration in den Zellen beobachten. Hinweise für eine Ausscheidung von RNA bzw. RNA-Bruchstücken, wie sie in anderen Fällen (Demain et al., 1965) beobachtet wurde, ergeben sich nicht.

| Inkubationsdauer (Tage) | 8 | 10 | 14 |
|---|---|---|---|
| intrazellulärer RNA-Gehalt (µmol Nucleotide/ 100 ml Kulturfiltrat) | 40 | 24 | 24 |
| extrazelluläre Nucleotide (µmol Nucleotide/ 100 ml Kulturfiltrat) | 20 | 76 | 48 |
| Summe der Nucleotide aus RNA und extrazellulären Nucleotiden (µmol/100 ml Kulturfiltrat) | 60 | 100 | 72 |
| Nucleotide in der RNA/extrazelluläre Nucleotide | 2,0 | 0,32 | 0,5 |

Tab. 12: Vergleich des intrazellulären RNA-Gehaltes mit den extrazellulären 3'-Ribonucleotiden während drei verschiedener Wachstumsphasen. Die Werte wurden der Abb. 13 entnommen.

Aus Tab. 12 und Abb. 13 geht hervor, daß am 8. Inkubationstag, dem Zeitpunkt der maximalen RNA-Konzentration, der Nucleotidgehalt der intrazellulären RNA 40 µmol/100 ml beträgt und vom 8. auf den 10. Inkubationstag eine Abnahme des Nucleotidgehaltes der RNA um 16 µmol/100 ml erfolgt. In dieser Zeitspanne beträgt die Zunahme der extrazellulären Nucleotide jedoch 56 µmol/100 ml (von 20 µmol/100 ml am 8. Tag auf 76 µmol/100 ml am 10. Tag), d. h. es werden 3,5 fach mehr Nucleotide in das Kulturmedium ausgeschieden wie intrazellulär durch Abbau der vorhandenen RNA entstehen können. Ebenso zeigt die Summe aus dem Nucleotidgehalt der intrazellulären RNA und den extrazellulären Nucleotiden, daß insgesamt eine Zunahme der Nucleotide erfolgt. Das bedeutet, daß neben dem Abbau der RNA Neusynthese stattfinden muß. Das Verhältnis der Nucleotide der RNA zu den extrazellulären Nucleotiden zu verschiedenen Inkubationszeiten zeigt, daß nach 8 Inkubationstagen (zum Zeitpunkt des maximalen intrazellulären RNA-Gehaltes) der Nucleotidgehalt der RNA doppelt so hoch ist wie der extrazelluläre Nucleotidgehalt. Bereits am 10. Inkubationstag verschiebt sich das Verhältnis sehr stark zugunsten der extrazellulären Nucleotide. Vom 10. zum 14. Inkubationstag steigt der Wert der Nucleotide in der RNA zu den extrazellulären Nucleotiden von 0,32 auf 0,50 an. Das ist auf eine Konzentrationsabnahme der extrazellulären Nucleotide um etwa 1/3 zurückzuführen.

Der RNA-Umsatz in den Zellen während der verschiedenen Wachstumsphasen wird durch radioaktiv markierte Basen verfolgt, die intrazellulär in die Nucleinsäuren eingebaut werden. Die Geschwindigkeit des Einbaus der Basen in die Nucleinsäuren und die Abnahme der Radioaktivität in der säureunlöslichen Fraktion sind ein Maß für den Umsatz der Nucleinsäuren. Die Versuche zeigen, daß die radioaktiv markierten Basen von den Zellen sehr

rasch aufgenommen und intrazellulär in die Nucleinsäuren eingebaut werden. Nach dem Einbau erfolgt eine starke Abnahme der Radioaktivität in der Nucleinsäurefraktion. Zum Zeitpunkt der höchsten Konzentration an Nucleotiden im Kulturmedium ist die intrazelluläre Radioaktivität bereits auf die Hälfte gesunken; ein großer Teil der vorher intrazellulären Radioaktivität findet sich extrazellulär in Form der 3'-Nucleotide wieder. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für einen starken Umsatz der RNA.

Die Ausscheidung der Nucleotide ist als Folge einer raschen Depolymerisierung der RNA durch Ribonucleasen und einer wesentlich langsamer verlaufenden Dephosphorylierung der anfallenden 3'-Nucleotide zu Nucleosiden durch die 3'-Nucleotidasen oder Phosphatasen aufzufassen. Die Ausscheidung von phosphorylierten Verbindungen durch intakte Zellen wird in der Natur nicht häufig beobachtet. In der Regel verhindert der ionisierte Phosphatrest einen freien Austausch einer phosphorylierten Substanz durch eine biologische Membran (Davis, 1958). Nur wenn es zu einem erheblichen Anstieg der Konzentration an phosphorylierten Metaboliten in einer Zelle oder in einem Zellkompartiment kommt, treten diese durch eine Membran.

Nach Ausscheidung der 3'-Ribonucleotide in das Kulturmedium und Erreichen des maximalen Wertes, nimmt die Konzentration der extrazellulären 3'-Ribonucleosidmonophosphate um etwa 1/3 wieder ab. Das ist auf einen teilweisen Abbau der Nucleotide zurückzuführen. Die starke Abnahme der Gesamtradioaktivität (Tab. 9) nach Markierung mit radioaktiven Basen und die Abnahme der Summe aus dem Nucleotidgehalt der RNA und den extrazellulären Nucleotiden zwischen dem 10. und 14. Inkubationstag bestätigen die obige Annahme. Der Abbau der Nucleotide erfolgt wahrscheinlich extrazellulär, weil im allgemeinen Nucleotide nicht die Zellmembran passieren können (Lichtenstein et al., 1960; Yagil und Beacham,

1975). Einen Hinweis für den extrazellulären Abbau der 3'-Nucleotide gibt die Untersuchung zur Zusammensetzung der UV-absorbierenden Metabolite in den verschiedenen Wachstumsphasen. Hier werden in den späten Wachstumsphasen neben den vier Gipfeln der 3'-Ribonucleosidmonophosphate zusätzlich Nucleoside und Basen von der Sephadex G-10 Säule eluiert (Abb. 3). Der Abbau der Nucleotide erfolgt also teilweise bis zu den Basen, teilweise auch darüber hinaus bis zu $CO_2$ und $NH_3$, was durch Messung der Radioaktivität im $CO_2$ bestätigt wurde (IV.6.3.2.). Durch den Abbau der Nucleotide können Base und/oder Zucker als C-Quelle genutzt werden.

| Inkubationsdauer (Tage) | 8 | 10 | 14 |
|---|---|---|---|
| Trockengewicht (mg/100 ml) | 145,0 | 92,0 | 92,0 |
| extrazelluläres Protein (mg/100 ml) | 4,2 | 10,0 | 21,5 |
| extrazelluläre Nucleotide (mg/100 ml) | 6,0 | 24,5 | 14,0 |
| Summe | 155,2 | 126,5 | 127,5 |

Tab. 13: Vergleich des Trockengewichtes mit dem Gewicht der extrazellulären Proteine und Nucleotide in mg/100 ml Kulturfiltrat während drei verschiedener Wachstumsphasen. Die Werte wurden der Abb. 12 entnommen.

Während der Konzentrationsabnahme der extrazellulären Nucleotide ist ein Anstieg der extrazellulären Proteine zu beobachten (Abb. 12 und Tab. 13). Tab. 13 zeigt, daß die Summe aus Trockengewicht, extrazellulären Proteinen

und extrazellulären Nucleotiden zwischen dem 10. und 14. Inkubationstag konstant bleibt. Die Abnahme der extrazellulären Nucleotide wird durch die Zunahme der extrazellulären Proteine ausgeglichen. Es kann also angenommen werden, daß der Abbau der extrazellulären Nucleotide für die Synthese der extrazellulären Proteine genutzt wird. Die Ausscheidung der extrazellulären Nucleotide sowie der extrazellulären Proteine und der teilweise Abbau der extrazellulären Nucleotide erklären damit auch die Abnahme des Trockengewichtes um etwa 35 %.
Die 3'-Nucleotidausscheidung in dieser Höhe liegt in der Größenordnung technisch verwertbarer Metabolitausscheidung (Ogata et al., 1976; Matsui et al., 1979). Praktisch dürfte diesem Prozess zumindest vorerst keine Bedeutung zukommen, da an 3'-Nucleotiden weder in der Biotechnik noch in der Forschung ein größerer Bedarf besteht.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Basidiomycet QM 806 scheidet unter bestimmten Bedingungen erhebliche Mengen an Purin- und Pyrimidinverbindungen in das Kulturmedium aus. Diese erreichen im Kulturmedium eine Konzentration bis zu 1 umol/ml. Dies liegt in der Größenordnung technisch verwertbarer Metabolitausscheidungen. Die Ausscheidung der Metabolite geht einher mit einer starken Abnahme des Trockengewichtes.

2. Diese Purin- und Pyrimidinverbindungen wurden nach säulenchromatographischer Trennung durch chemisch-analytische und durch biologische Untersuchungsverfahren als die vier üblichen 3'-Ribonucleosidmonophosphate (3'-AMP, 3'-CMP, 3'-GMP, 3'-UMP) identifiziert. Sie werden in annähernd äquimolarer Konzentration in das Kulturmedium ausgeschieden.

3. Die starke extrazelluläre Akkumulation der 3'-Ribonucleosidmonophosphate wird auf einen intensiven Abbau bereits vorhandener RNA zurückgeführt und auf eine gleichzeitige hohe RNA-Neusynthese. Durch den hohen Umsatz der RNA wird die Kapazität der nucleotidabbauenden Enzyme überschritten, so daß es zu einem erheblichen Anstieg der Konzentration an 3'-Nucleotiden kommt.

4. Ungefähr 1/3 der extrazellulären 3'-Nucleotide werden in einer späteren Wachstumsphase wieder verwertet. Während die extrazelluläre Konzentration der 3'-Nucleotide abnimmt, steigt die Konzentration der extrazellulären Proteine (Enzyme). Das läßt darauf schließen, daß der RNA-Abbau zugunsten der Synthese der extrazellulären Enzyme erfolgt.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Akiya, T., Y. Midorikawa, A. Kuninaka, H. Yoshino und Y. Ikeda
Accumulation of 5'-inosinic acid and 5'-xanthylic acid by Bacillus subtilis.
Agr. Biol. Chem., 36, 227 - 233 (1972)

2. Albaum, H.G. und W. W. Umbreit
Differentiation between ribose-3-phosphate and ribose-5-phosphate by means of the orcinol-pentose reaction.
J. Biol. Chem. 167, 369 - 376 (1947)

3. Anraku, Y.
A new cyclic phosphodiesterase having a 3'-nucleotidase activity from Escherichia coli B.
J. Biol. Chem. 239, 3412 - 3419 (1964)

4. Beaven, G. H., E. R. Holiday und E. A. Johnson
in The Nucleic Acids 2, 493 (1955) Hrsg. Chargaff, E. und N. J. Davidson, Acad. Press N. Y., London

5. Bohinski, R. C. und M. F. Mallette
Response of log-phase cells of Escherichia coli to medium limited in both sulfate and phosphate.
J. Bacteriol. 93, 1316 - 1326 (1967)

6. Borek, E., A. Ryan und J. Rockenbach
Nucleic acid metabolism in relation to the lysogenic phenomenon.
J. Bacteriol. 69, 460 - 467 (1955)

7. Burton, K.
A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.
Biochem. J. 62, 315 - 323 (1956)

8. Davern, C. I. und M. Meselson
The molecular conservation of ribonucleic acid during bacterial growth.
J. Mol. Biol. 2, 153 - 160 (1960)

9. Davis, B. D.
On the importance of being ionized.
Arch. Biochem. Biophys. 78, 497 - 509 (1958)

10. Demain, A. L., R. W. Burg und D. Hendlin
Excretion and degradation of ribonucleic acid by Bacillus subtilis.
J. Bacteriol. 89, 640 - 646 (1965)

11. Demain, A. L., I. M. Miller und D. Hendlin
Production of extracellular guanosine-5'-monophosphate by Bacillus subtilis.
J. Bacteriol. 88, 991 - 995 (1964)

12. Elson, D.
Latent enzymic activity of a ribonucleoprotein isolated from Escherichia coli.
Biophys. Biochim. Acta 36, 372 - 386 (1959)

13. Fiske, C. H. und Y. SubbaRow
The colorometric determination of phosphorus.
J. Biol. Chem. 66, 375 - 400 (1925)

14. Förster, E. und A. W. Holldorf
Cytidin und Desoxycytidin in
Methoden der enzymatischen Analyse II, 1971 - 1975 (1974) Hrsg. Bergmeyer, H. U.

15. Friebe, B.
Die Kontrolle von Exoenzym-Aktivitäten beim Basidiomyceten Species QM 806.
Dissertation Bochum (1973)

16. Friebe, B. und A. W. Holldorf
Control of extracellular ß-1,3-glucanase activity in a Basidiomycete species.
J. Bacteriol. 122, 818 - 825 (1975)

17. Gorbach, G. und J. Henke
Gelchromatographische Trennung der Nucleinsäurebausteine an Sephadex G-25 Fine, G-15 und G-10.
J. Chromatog. 37, 225 - 233 (1968)

18. Haneda, K., A. Hirano, R. Kodaira und S. Ohuchi
Accumulation of nucleic acid-related substances by microorganisms. Part II. Production of adenosine by mutants derived from Bacillus sp.
Agr. Biol. Chem. 35, 1906 - 1912 (1971)

19. Hanes, C. S. und F. A. Isherwood
Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram.
Nature 164, 1107 - 1112 (1949)

20. Horiuchi, T., S. Horiuchi und D. Mizuno
Degradation of ribonucleic acid in Escherichia coli in phosphorus-deficient culture.
Biochim. Biophys. Acta 31, 570 - 572 (1959)

21. Horiuchi, T., S. Horiuchi und D. Mizuno
A possible negative feedback phenomenon controlling formation of alkaline phosphomonoesterase in Escherichia coli.
Nature 183, 1529 - 1530 (1959)

22. Kaplan, R. und D. Apirion
The fate of ribosomes in Escherichia coli cells starved for a carbon source .
J. Biol. Chem. 250, 1854 - 1863 (1975)

23. Kaplan, R. und D. Apirion
Decay of ribosomal ribonucleic acid in Escherichia coli cells starved for various nutrients.
J. Biol. Chem. 250, 3174 - 3178 (1975)

24. Kennel, D. und B. Magasanik
The relation of ribosome content to the rate of enzyme synthesis in Aerobacter aerogenes.
Biochim. Biophys. Acta 55, 139 - 151 (1962)

25. Kennel, D. und A. Kotoulas
Magnesium starvation of Aerobacter aerogenes.
I. Changes in nucleic acid composition.
J. Bacteriol. 93, 334 - 344 (1967)

26. Kirby, K. S.
Some new solvent systems for the paper chromatography of nucleic acid degradation products.
Biochim. Biophys. Acta 18, 575 - 576 (1955)

27. Lichtenstein, J., H. D. Barner und S. S. Cohen
The metabolism of exogenously supplied nucleotides by Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 235, 457 - 465 (1960)

28. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

29. Lüpke, U. und F. Seela
Seltene Nucleoside.
Chemie in unserer Zeit 12, 189 - 198 (1978)

30. Maruyama, H. und D. Mizuno
Ribosome degradation and the degradation products in starved Escherichia coli. I. Comparison of the degradation rate and of the nucleotide pool between Escherichia coli B and Q-13 strains in phosphate deficiency.
Biochim. Biophys. Acta 109, 159 - 165 (1970)

31. Maruyama, H., M. Ono und D. Mizuno
Ribosome degradation and the degradation products in starved Escherichia coli. III. Ribosomal RNA degradation during the complete deprivation of nutrients.
Biochim. Biophys. Acta 199, 176 - 183 (1970)

32. Maruyama, H., M. Ono-Onitsuka und D. Mizuno
Ribosomal RNA degradation products in starved Escherichia coli. IV. The cellular components excreted into the media during different deprivation conditions.
J. Biochem. 67, 559 - 565 (1970)

33. Matsui, H., K. Sato, H. Enei und Y. Hirose
A guanosine-producing mutant of Bacillus subtilis with high productivity.
Agr. Biol. Chem. 43, 393 - 394 (1979)

34. Mc Carthy, B. J.
The effects of magnesium starvation on the ribosome content of Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 55, 880 - 888 (1962)

35. Mc Closky, J. A. und S. Nishimura
Modified nucleosides in transfer RNA
Acc. Chem. Res. 10, 403 - 410 (1977)

36. Mejbaum, W.
Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen, insbesondere in Derivaten der Adenylsäure.
Z. physiol. Chem. 258, 117 - 120 (1939)

37. Mitchell, H. K., M. B. Houlahan und J. F. Nyc
The accumulation of orotic acid by a pyrimidine-less mutant of Neurospora.
J. Biol. Chem. 172, 525 - 529 (1948)

38. Näher, G.
Adenin und Guanin in
Methoden der enzymatischen Analyse II, 1957 - 1963
(1974) Hrsg. Bergmeyer, H. U.

39. Natori, S., R. Nozawa und D. Mizuno
The turnover of ribosomal RNA of Escherichia coli
in a magnesium-deficient stage.
Biochim. Biophys. Acta 114, 245 - 253 (1966)

40. Neu, H.C. und L. A. Heppel
Nucleotide sequence analysis of polyribonucleotides
by means of periodate oxidation followed by cleavage
with an amine.
J. Biol. Chem. 239, 2927 - 2934 (1964)

41. Nossal, N. G. und M. F. Singer
The processive degradation of individual polyribo-
nucleotide chains. II. Escherichia coli ribonuclease II.
J. Biol. Chem. 243, 913 - 922 (1968)

42. Nozawa, R.,T. Horiuchi und D. Mizuno
Degradation of ribosomal RNA in a temperature-sen-
sitive Escherichia coli.
Arch. Biochem. Biophys. 118, 402 - 409 (1967)

43. O'Donovan, G. A. und J. Neuhard
Pyrimidine metabolism in microorganisms.
Bact. Rev. 34, 278 - 343 (1970)

44. Ogata, K., S. Kinoshita, T. Tsunoda und K. Aida
Microbial production of nucleic acid-related substances.
Halsted Press, New York, N. Y. U.S.A. (1976)

45. Ozaki, H. und I. Shiio
Two cytoplasmic 5'-nucleotidases of Bacillus sub-
tilis K.
J. Biochem. 85, 1083 - 1089 (1979)

46. Partridge, S. M.
Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars.
Nature 164, 443 (1949)

47. Pataki, G.
Thin-layer chromatography of nucleic acid bases, nucleosides, nucleotides and related compounds. III. Separation of complex mixtures on cellulose layers.
J. Chromatog. 29, 126 - 132 (1967)

48. Reese, E. T. und M. Mandels
ß-D-1,3-glucanases in fungi.
Can. J. Microbiol. 5, 173 - 185 (1959)

49. Rustum, Y. M. und H. S. Schwartz
Methods for the separation and identification of ribonucleotides on DEAE-Cellulose.
Anal. Biochem. 53, 411 - 419 (1973)

50. Schlessinger, D. und F. Ben-Hamida
Turnover of protein in Escherichia coli starving for nitrogen.
Biochim. Biophys. Acta 119, 171 - 182 (1966)

51. Simmonovitz, M. und A. F. Graham
The metabolic stability of nucleic acids in Escherichia coli.
Can. J. Microbiol. 2, 585 - 597 (1956)

52. Spahr, P. F. und B. R. Hollingworth
Purification and mechanism of action of ribonuclease from Escherichia coli ribosomes.
J. Biol. Chem. 236, 823 - 831 (1961)

53. Spiro, R. G.
Studies on fetuin, a glycoprotein of fetal serum.
I. Isolation, chemical composition, and physico-chemical properties.
J. Biol. Chem. 235, 2860 - 2869 (1960)

54. Stewart, P. R. und D. S. Letham
The ribonucleic acids.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1973)

55. Strange, R. E., F. A. Dark und A. G. Ness
The survival of stationary phase Aerobacter aerogenes stored in aqueous suspension.
J. Gen. Microbiol. 25, 61 - 76 (1961)

56. Suhadolnik, R. J.
Nucleoside antibiotics.
Wiley-Interscience, New York (1970)

57. Torriani, A.
Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by Escherichia coli.
Biochim. Biophys. Acta 38, 460 - 469 (1960)

58. Wasternak, C. und H. Reinbothe
Trennung von Nukleinsäurebausteinen und ihren Strukturanalogen an Sephadex G-10.
J. Chromatog. 48, 551 - 555 (1970)

59. Womack, J. E. und G. A. O'Donovan
Orotic acid excretion in some wild-type strains of Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol. 136, 825 - 827 (1978)

60. Yagil, E. und I. R. Beacham
Uptake of adenosine 5'-monophosphate by Escherichia coli.
J. Bacteriol. 121, 401 - 405 (1975)

61. Yates, R. A. und A. B. Pardee
Control of pyrimidine biosynthesis in Escherichia coli by a feedback mechanism.
J. Biol. Chem. 221, 757 - 770 (1956)

Herrn Prof. Dr. A. W. Holldorf danke ich für die Überlassung des Themas und für hilfreiche Diskussionen.

Für wertvolle Ratschläge und Unterstützung im Verlaufe der Arbeit danke ich Frau Dr. B. Friebe recht herzlich.

Herrn Dr. D. Müller danke ich für seine Hilfe bei den massenspektroskopischen Untersuchungen.

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 30. 4. 1949 | geboren in Duisburg als Tochter der Eheleute Helmut und Martha Stumm, geb. Schöllmann |
| 1956 - 1960 | Besuch der Evangelischen Volksschule in Duisburg-Meiderich |
| 1960 - 1968 | Besuch des Käthe-Kollwitz-Gymnasiums in Duisburg-Ruhrort |
| 16. 5. 1968 | Abitur |
| 1968 - 1970 | Ausbildung als medizinisch-technische Assistentin in Moers |
| 1970 - 1971 | Tätigkeit als MTA am Bakteriologischen Untersuchungsamt in Moers |
| 1971 | Beginn des Biologiestudiums an der Ruhr-Universität Bochum |
| 1973 | Diplom-Vorprüfung in Biologie |
| 1976 | Diplomarbeit unter Prof. Dr. U. Winkler über das Thema: Die Wirkung von Alkali- und Erdalkalimetall-Ionen auf die cAMP-induzierte Exolipase-Bildung von Serratia marcescens. |
| 1976 - 1979 | Anfertigung der Dissertation unter Prof. Dr. A. W. Holldorf am Institut für Physiologische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum |